

УДК 614.8:[615.9:661.744.224]

ИЗУЧЕНИЕ ЭМБРИОТОКСИЧЕСКОГО И ТЕРАТОГЕННОГО ДЕЙСТВИЯ ДИИЗОННИЛФТАЛАТА

В.А. Грынчак¹, С.И. Сычик¹,
Е.К. Власенко¹, И.И. Ильюкова¹,
С.Н. Рябцева²

¹ Республиканское унитарное предприятие
«Научно-практический центр гигиены»,
Министерство здравоохранения Республики
Беларусь, 220012, г. Минск, Республика
Беларусь

² Учреждение образования «Белорусский
государственный медицинский университет»,
Министерство здравоохранения Республики
Беларусь, 220116, г. Минск, Республика
Беларусь

Проведены токсикологические исследования по изучению влияния диизонилфталата (ДИНФ) на репродуктивную систему белых крыс. В эксперименте использовали схему А.А. Динерман, которая позволяет регистрировать эмбриотропные и тератогенные эффекты с учетом динамики развития потомства в постнатальном периоде. Наличие аномалий развития внутренних органов эмбрионов определяли методом сагиттальных срезов по W. Wilson. Установлено, что внутрижелудочное введение изучаемого соединения самкам на протяжении периода беременности в дозах 100, 1000 и 10000 мг/кг инициировало внешние и внутренние пороки развития эмбрионов. Уровень воздействия 10000 мг/кг характеризуется увеличением общей постимплантационной и эмбриональной смертностью, наличием множественных пороков развития эмбрионов. При этом по показателям постнатального развития потомства достоверных изменений по сравнению с контролем не обнаружено. В эксперименте установлена максимально недействующая доза 10 мг/кг ДИНФ, при которой признаков тератогенного и эмбриотропного действия не выявлено.

Ключевые слова: диизонилфталат, токсичность, эмбриотоксичность, тератогенность.

Введение. В настоящее время широкое применение для производства изделий на полимерной основе находит новое соединение – диизонилфталат (ДИНФ), химические свойства которого позволяют отказаться от существующих пластификаторов – дибутилфталата и диоктилфталата.

По данным Всемирной организации здравоохранения фталаты оказывают негативное воздействие на эндокринную и нервную системы, обладают способностью индуцировать ряд отдаленных эффектов, включая канцерогенные. Соединения с такими свойствами присутствуют в составе упаковки для пищевых продуктов, в

бытовой технике, изделиях медицинского назначения, игрушках для детей и т.д.

Опасные свойства основных фталатов для здоровья и среды обитания человека в целом изучены хорошо. Законодательно установлены допустимые уровни миграции в водную и воздушную среды для диметилфталата, диэтилфталата, диметилтерефталата, диоктилфталата и дибутилфталата. В тоже время, для продукции, содержащей ДИНФ, отсутствуют требования гигиенической безопасности, что не дает оснований ее считать безопасной для потребителя.

Для обеспечения безопасного обращения продукции на полимерной основе необходи-

Грынчак Виталий Александрович (Grynchak Vitali Aleksandrovich), аспирант, младший научный сотрудник лаборатории профилактической и экологической токсикологии Республиканского унитарного предприятия «Научно-практический центр гигиены», 220012, г. Минск, grinchakva@gmail.com 8 (017) 284-13-82

Сычик Сергей Иванович (Syhik Sergey Ivanovich), кандидат медицинских наук, доцент, директор Республиканского унитарного предприятия «Научно-практический центр гигиены», 220012, г. Минск, rspch@rspch.by

Власенко Евгений Константинович (Vlasenko Eugene Konstantinovich), кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории профилактической и экологической токсикологии Республиканского унитарного предприятия «Научно-практический центр гигиены», 220012, г. Минск, evgenii_vlasenko@mail.ru

Ильюкова Ирина Ивановна (Ilyukova Irina Ivanovna), кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией профилактической и экологической токсикологии Республиканского унитарного предприятия «Научно-практический центр гигиены», 220012, г. Минск, toxlab@mail.ru

Рябцева Светлана Николаевна (Rjabceva Svetlana Nikolaevna), кандидат медицинских наук, ассистент кафедры патологической анатомии Учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет», Министерство здравоохранения Республики Беларусь, 220116, г. Минск, sveta.rjabceva@tut.by

мо осуществление токсиколого-гигиенической оценки с обоснованием мер гигиенического регулирования ДИНФ. Анализ литературы показывает, что сведения о биологических свойствах данного соединения представлены эпизодично, практически отсутствуют данные об уровне его токсичности и опасности, не выявлены закономерности токсикодинамики, нет сведений о механизмах токсического действия. Вышеизложенное свидетельствует о необходимости разработки лимитирующих показателей вредности для определения допустимых уровней миграции ДИНФ из полимерной продукции [1,2].

Одним из компонентов изучения возможно отрицательного воздействия вредного химического фактора является идентификация опасности репродуктивной токсичности, что достигается путем экстраполяции на человека экспериментальных данных, полученных в опытах на целостном организме животного [3,4].

Целью настоящих исследований является изучение влияния ДИНФ на репродуктивную функцию белых крыс с учетом изменений, возникающих в постнатальном развитии и определением недействующих уровней доз.

Материалы и методы исследования. Изучению подвергали ДИНФ, представляющий собой прозрачную бесцветную маслянистую жидкость, без запаха, практически нерастворимую в воде, номер CAS 28553-12-0.

Эксперименты по изучению эмбриотропного и тератогенного действия проводили на 105 рандомбредных половозрелых крысах-самках с массой тела 160-180 г. Выбор белых крыс обусловлен тем, что крысы и человек имеют одинаковый гемохориальный тип плаценты, крысы удобны в эксперименте и у них редко возникают спонтанные аномалии развития. При этом, длительность беременности у крыс составляет 22 дня. При постановке исследований обращали внимание на полноценность пищевого рациона и тщательность ухода за животными, так как каждый из этих факторов сам по себе может оказать влияние на состояние эмбрионального развития и функциональное состояние плаценты.

При отборе крыс-самок руководствовались наличием у них нормального эстрального цикла, включающего все 4 стадии общей продолжительностью 4-6 дней и характеризующегося ритмичностью циклирования. При наличии фазы эструса проводили спаривание самок с самцами. Спаривание проводили в вечернее время. Самок подсаживали к одной и той же группе самцов в соотношении 2:1.

Первый день беременности устанавливали на основании обнаружения сперматозоидов в ва-

гинальном мазке нормально циклирующих самок. Изучение эмбриотоксичности проводили по методу, предложенному А.А. Динерман [5]. Суть данного метода заключается в комбинированной схеме постановки эксперимента по изучению эмбриотоксического и тератогенного действия с учетом состояния потомства в постнатальном периоде.

Схема эксперимента предусматривала многократное внутрижелудочное введение ДИНФ на протяжении 20 дней беременности самкам крыс, распределенным по 21 особи в 5 подопытных группах. I группе вводили дистиллированную воду в объеме 2 мл (контрольная), опытные группы получали ДИНФ в дозах: II группа – 10 мг/кг, III группа – 100 мг/кг, IV группа – 1000 мг/кг и V группа – 10000 мг/кг массы тела.

На 20-й день беременности, когда эмбрион достигает значительных размеров и, в основном, закончен органогенез, проводили умерщвление 11 из 21 самки в каждой группе методом мгновенной декапитации. После вскрытия беременных самок в яичниках подсчитывали число желтых тел. Рога матки вскрывали по наружному краю, подсчитывали число живых и погибших эмбрионов. Эмбрионы фиксировали в растворе Буэна. В протоколе указывали день вскрытия, характер воздействия на самку, дозу препарата, число живых и погибших эмбрионов, а также число желтых тел каждого яичника. Затем определяли среднее число особей в помете, массу и длину каждого эмбриона, визуально регистрировали наличие внешних аномалий развития эмбрионов. Рассчитывали общую эмбриональную, преимплантационную и постимплантационную смертность. Для вычисления этих показателей использовали данные о количестве живых эмбрионов, погибших эмбрионов и числе желтых тел.

Наличие аномалий развития внутренних органов эмбрионов определяли с помощью метода сагиттальных срезов, предложенного W. Wilson в модификации [6]. Все срезы просматривали с помощью бинокулярной лупы МБС-1 (Россия).

Оставшиеся по 10 самок в каждой группе на 22-й день беременности приносили помет. Изучение состояния потомства в постнатальном периоде проводили с использованием показателей физического развития. По достижении потомства трехмесячного возраста самцов умерщвляли методом мгновенной декапитации. Морфофункциональные показатели гонад изучали по показателям общей концентрации сперматозоидов, концентраций подвижных и неподвижных сперматозоидов, средней скорости подвижных сперматозоидов при помощи спермоанализатора БИОЛА АФС-500-2, Россия.

Фиксировали также изменения ряда функциональных и морфометрических показателей гонад, характеризующих генеративную функцию животных, включая относительные коэффициенты массы (ОКМ) семенников и придатков.

Результаты исследований обрабатывали общепринятыми методами вариационной статистики. При оценке различий между группами использовали параметрический t-критерий Стьюдента с учетом поправки Бонферрони или непараметрический U-критерий Манна-Уитни. Количественные параметры представлены в виде среднего значения (M) и 95% доверительного интервала ($\pm 95\%$ ДИ), либо в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха [25%;75%]. Критическим уровнем значимости при проверке статистических гипотез был принят $p \leq 0,05$. Обращение с животными соответствовало международным требованиям [7].

Результаты и обсуждение. На протяжении эксперимента (период беременности и роды) гибель и клинические признаки интоксикации самок крыс в опытных группах и контроле отсутствовали.

Изучение эмбрионального развития потомства крыс в группе V (10000 мг/кг) достоверно показало снижение числа живых эмбрионов и среднего числа особей в помете на одну самку по сравнению с контролем. Увеличилось число погибших эмбрионов, как следствие достоверно изменилась общая эмбриональная и постимплантационная смертность. В остальных опытных группах показатели оставались в пределах нормального эмбриогенеза (табл. 1).

При внешнем осмотре эмбрионов и при изучении состояния их внутренних органов методом сагиттальных срезов контрольной группы и группы I (10 мг/кг) отклонений от анатомической нормы не обнаружено. В опытной группе III (100 мг/кг) было установлено уменьшение размера глазных яблок у 5 эмбрионов (микрофтальмия, 4,8%). Эта же аномалия развития наблюдалась и в группах IV (1000 мг/кг) и V (10000 мг/кг). Также в этих группах (IV и V) выявлен ряд аномалий развития: частичное отсутствие свода черепа, черепно-мозговая грыжа, гидроцефалия, анэнцефалия, микрогнатия,

Таблица 1

Показатели эмбрионального развития крыс при ежедневном (20 дней) внутривентрикулярном введении ДИНФ беременным самкам, M (95%ДИ), либо Me [25%;75%]

Показатели, единицы измерения	Группы сравнения, уровень воздействия ДИНФ				
	I контроль	II 10 мг/кг	III 100 мг/кг	IV 1000 мг/кг	V 10000 мг/кг
Число живых эмбрионов, шт	9,0 [8,0;11,0]	9,0 [8,0;10,0]	10,0 [8,0;11,0]	10,0 [9,0;10,0]	5,0 [2,0;9,0]*
Число погибших эмбрионов, шт	0	0	0	0 [0;1,0]	2,0 [0;5,0]*
Число желтых тел, шт	11,0 [11,0;13,0]	10,0 [9,0;11,0]	11,0 [11,0;13,0]	12,0 [10,0;13,0]	11,0 [10,0;12,0]
Общая эмбриональная смертность, %	15,38 [0,00;25,0]	10,0 [0;0,16,7]	15,38 [9,1;28,6]	23,08 [9,1;33,3]	54,55 [18,2;80,0]*
Преимплантационная смертность, ед.	0,15 [0;0,23]	0,10 [0;0,17]	0,11 [0,9;0,27]	0,15 [0,07;0,27]	0,3 [0,14;0,36]
Постимплантационная смертность, ед.	0	0	0	0 [0;0,091]	0,29 [0;0,67]*
Среднее число особей в помете, шт	9,0 [9,0;10,0]	9,0 [7,0;10,0]	9,0 [8,0;10,0]	8,5 [6,0;10,0]	6,5 [5,0;7,0]*
Масса одного эмбриона, г	2,3 (2,0-2,5)	2,2 (1,9-2,5)	2,2 (2,0-2,5)	2,4 (2,0-2,7)	2,3 (1,9-2,6)
Длина одного эмбриона, мм	31,0 (29,0-33,0)	32,0 (30,0-34,0)	31,0 (29,0-32,0)	32,0 (29,5-34,0)	32,0 (30,0-34,0)

Примечание: * – различия статистически достоверны, $p < 0,05$.

Таблица 2

Аномалии развития эмбрионов крыс

Показатели, единицы измерения	Группы сравнения, уровень воздействия ДИНФ				
	I контроль	II 10 мг/кг	III 100 мг/кг	IV 1000 мг/кг	V 10000 мг/кг
Микрофтальмия, шт (%)	0 / 104	0 / 99	5 / 104 (4,8%)	7 / 106 (6,6%)	8 / 65 (12,3%)
Анэнцефалия, шт (%)	0 / 104	0 / 99	0 / 104	0 / 106	6 / 65 (9,2%)
Гидроцефалия, шт (%)	0 / 104	0 / 99	0 / 104	0 / 106	6 / 65 (9,2%)
Энцефалоцеле, шт (%)	0 / 104	0 / 99	0 / 104	0 / 106	4 / 65 (6,2%)
Акрония, шт (%)	0 / 104	0 / 99	0 / 104	0 / 106	4 / 65 (6,2%)
Микрогнатия, шт (%)	0 / 104	0 / 99	0 / 104	0 / 106	3 / 65 (4,6%)
Гипоплазия нижней доли легкого, шт (%)	0 / 104	0 / 99	0 / 104	0 / 106	2 / 65 (3,1%)
Отсутствие межжелудочковой перегородки, шт (%)	0 / 104	0 / 99	0 / 104	12 / 106 (11,3%)	13 / 65 (20%)
Эвентрация кишечника и/или печени, шт (%)	0 / 104	0 / 99	0 / 104	6 / 106 (5,7%)	10 / 65 (15,4%)
Общее количество аномалий развития, шт (%)	0	0	5 (4,8%)	25 (23,6%)	56 (86,2%)
Количество эмбрионов с аномалиями развития, шт (%)	0	0	5 (4,8%)	25 (23,6%)	32 (49,2%)

гипоплазия нижней доли легкого, отсутствие межжелудочковой перегородки, эвентрация кишечника и/или печени (табл. 2). При этом, доза 10000 мг/кг исследуемого соединения вызывала множественные пороки развития, которые характеризовались сочетанием эвентрации кишечника и/или печени, микрофтальмии, анэнцефалии, гидроцефалии, акронии, отсутствием межжелудочковой перегородки. Таким образом, морфологически были обнаружены признаки выраженного негативного (тератогенного) действия на плод.

Наблюдения за процессом постнатального развития крысят проводили, начиная со дня рождения до 60-дневного возраста. Установлено, что по параметрам физического развития подопытные крысята не отличались от контрольных. Так, независимо от групповой принадлежности, отлипание ушной раковины у крысят наступало на 2-3 день жизни, обрастание шерстью на 5-6 дни, прорезывание резцов на 8-9 день жизни, открытие глаз – на 13-16 день жизни (табл. 3).

При изучении показателей состояния репродуктивной системы потомства (самцы крыс) на 60-й день жизни произведено умерщвление животных подопытных групп методом мгновенной декапитации. Макроскопическое обследование семенников и придатков у животных всех групп не обнаружило видимой патологии. В подопытных группах не наблюдалось достоверных отклонений показателей, характеризующих генеративную функцию – ОКМ семенников и придатков, общей концентрации, концентрации подвижных и неподвижных сперматозоидов, средней скорости подвижных сперматозоидов (табл. 4).

Заключение. В ходе исследования установлено, что внутрижелудочное введение ДИНФ самкам на протяжении периода беременности в дозах 100, 1000 и 10000 мг/кг инициировало формирование внешних и внутренних пороков развития эмбрионов, таких как микрофтальмия, анэнцефалия, гидроцефалия, акрония, микрогнатия, гипоплазия легкого, отсутствие межжелудочко-

Таблица 3

Показатели постнатального развития потомства крыс, М ($\pm 95\%$ ДИ)

Показатели, единицы измерения	Группы сравнения, уровень воздействия ДИНФ				
	I контроль	II 10 мг/кг	III 100 мг/кг	IV 1000 мг/кг	V 10000 мг/кг
на 1 сутки					
Масса, г	6,1 (5,8-6,5)	6,2 (5,8-6,6)	6,3 (5,7-6,7)	6,2 (5,9-6,5)	6,3 (5,9-6,5)
Длина, мм	46,0 (44,0-47,0)	46,0 (44,0-47,0)	45,0 (44,0-47,0)	44,0 (43,0-47,0)	45,5 (44,0-47,0)
на 10 сутки					
Масса, г	6,1 (5,8-6,5)	6,2 (5,8-6,6)	6,3 (5,7-6,7)	6,2 (5,9-6,5)	6,3 (5,9-6,5)
Длина, мм	67,0 (55,0-81,0)	67,0 (63,0-70,0)	67,0 (60,0-74,0)	69,0 (51,0-78,0)	67,0 (31,0-87,0)
на 30 сутки					
Масса, г	55,4 (50,3-61,0)	57,7 (50,4-65,4)	51,4 (45,1-66,2)	61,8 (42,5-66,5)	58,0 (53,8-65,2)
Длина, мм	109,0 (105,0-112,0)	109,0 (105,0-113,0)	105,0 (98,0-112,0)	110,0 (100,0-115,0)	110,0 (106,0-117,0)
на 60 сутки					
Масса, г	145,0 (125,0-150,0)	147,5 (130,0-165,0)	140,0 (130,0-160,0)	150,0 (113,0-170,0)	149,0 (130,0-170,0)
Длина, мм	155,0 (150,0-161,0)	154,5 (150,0-161,0)	152,0 (149,0-157,0)	152,0 (145,0-158,0)	152,0 (148,0-160,0)

Таблица 4

Морфофункциональные показатели гонад потомства (самцов) крыс при внутрижелудочном введении ДИНФ беременным самкам, М (95%ДИ)

Показатели, единицы измерения	Группы сравнения, уровень воздействия ДИНФ				
	I контроль	II 10 мг/кг	III 100 мг/кг	IV 1000 мг/кг	V 10000 мг/кг
ОКМ семенников, г/кг-3	15,3 (41,4-15,4)	14,8 (13,2-15,6)	14,9 (14,8-15,1)	14,7 (14,5-15,3)	15,0 (14,7-15,6)
ОКМ придатков, г/кг-3	4,1 (3,8-4,3)	4,4 (3,8-4,5)	3,6 (3,5-3,8)	4,5 (4,0-4,7)	4,5 (4,0-4,7)
Общая концентрация сперматозоидов, млн/мл	73,4 (62,0-77,8)	69,7 (64,2-72,0)	64,6 (48,0-71,8)	69,1 (59,4-71,8)	69,7 (64,2-80,0)
Концентрация подвижных сперматозоидов, млн/мл	62,4 (53,8-66,3)	62,7 (56,6-75,5)	56,7 (43,2-66,8)	62,1 (53,0-70,4)	63,4 (58,7-78,4)
Концентрация неподвижных сперматозоидов, млн/мл	7,1 (2,2-12,0)	6,7 (3,2-10,5)	2,5 (1,3-10,3)	4,1 (1,9-6,4)	3,1 (1,6-12,3)
Средняя скорость подвижных сперматозоидов, мкм/сек	65,0 (60,0-66,4)	61,3 (59,2-64,2)	62,9 (60,9-65,6)	62,0 (59,3-63,0)	63,8 (60,9-64,6)

вой перегородки, эвентрация кишечника и/или печени. Уровень воздействия 10000 мг/кг характеризуется увеличением общей постимплантационной и эмбриональной смертности, наличием множественных (сочетанных) пороков развития эмбрионов. При этом по показателям пост-

натального развития потомства достоверных по сравнению с контролем изменений не обнаружено. В эксперименте установлена максимально недействующая доза 10 мг/кг ДИНФ, при которой признаков тератогенного и эмбриотропного действия не выявлено.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Грынчак В.А., Сычик С.И. Актуальные проблемы безопасного обращения диизонил фталата. Труды Белорусского государственного университета. Серия: Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем. 2016; 11 : 36-46.
2. Грынчак В.А. Актуальность токсиколо-гигиенической оценки диизонил фталата как химического

- вещества нарушающего работу эндокринной системы. В кн.: Сборник материалов школы молодых ученых «Основы здорового питания и пути профилактики алиментарно-зависимых заболеваний», М.; 2016; ч.1 : 66-71.
3. WHO. IPCS Environmental Health Criteria 170: Assessing Human Health Risks of Chemicals: Derivation of Guidance Values for Health-based

- Exposure limits. Geneva: World Health Organization; 1994; 75.
4. Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment. U.S. EPA. Sept. 1996; 163.
 5. Динерман А.А. Роль загрязнителей окружающей среды в нарушении эмбрионального развития. М.: Медицина; 1980.
 6. Дыбан А.П., Баранов В.С., Акимов И.М. Основные методические под-

- ходы к тестированию тератогенной активности химических веществ. В кн.: Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. М.: 1970; 59 : 89-100.
7. Guide for the care and use of laboratory animals. Institute of laboratory animal resources commission on life sciences research council. National academy press. Washington, D.C. 1996; 1: 128.

REFERENCES:

1. Grynchak V.A., Sychik S.I. Actual problems of safe handling of diisononyl phthalate. Proceedings of the Belarussian State University. Series: Physiological, biochemical and molecular basis of functioning of biosystems. 2016; 11 : 36-46 (in Russian).
2. Grynchak V.A. The relevance of the toxicological and hygienic assessment of diisononyl phthalate as a chemical

- that disrupts the endocrine system. In: Collection of materials of the School of Young Scientists «Fundamentals of Healthy Nutrition and Ways to Prevent Alimentary-Dependent Diseases», M.; 2016; ch.1 : 66-71 (in Russian).
3. WHO. IPCS Environmental Health Criteria 170: Assessing Human Health Risks of Chemicals: Derivation of Guidance Values for Health-based Exposure limits. Geneva: World Health

- Organization; 1994; 75.
4. Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment. U.S. EPA. Sept. 1996; 163.
 5. Dinerman A.A. The role of environmental pollutants in violation of embryonic development. M.: Medicina; 1980 (in Russian).
 6. Dyban A.P., Baranov V.S., Akimov I.M. Basic methodical approaches to testing teratogenic activity of chemical

- substances. In: Archive of anatomy, histology and embryology. M.: 1970; 59 : 89-100 (in Russian).
7. Guide for the care and use of laboratory animals. Institute of laboratory animal resources commission on life sciences research council. National academy press. Washington, D.C. 1996; 1: 128.

V.A. Grynchak¹, S.I. Sychik¹, E.K. Vlasenko¹, I.I. Ilyukova¹, S.N. Ryabceva²

THE STUDY OF EMBRYOTOXIC AND TERATOGENIC EFFECTS OF DIISONONYL PHTHALATE

¹ Republican unitary enterprise «Scientific -practical center of hygiene», Ministry of Health of the Republic of Belarus, 220012 Minsk, Belarus

² Educational Institution «The Belarussian State Medical University», Ministry of Health of the Republic of Belarus, 220116 Minsk, Belarus

Toxicological studies were conducted on impact of diisononyl phthalate (DINP) on the reproductive system of white rats. In experiments, A. Dinerman's scheme was applied which allows recording embryotropic and teratogenic effects taking into account the dynamics of the development of offspring in the postnatal period. The presence of anomalies in the development of embryos internal organs was determined by the sagittal section method according to W. Wilson. It was found out that intragastric administration of the test compound to females during the pregnancy period at doses of 100, 1000 and 10,000 mg/kg initiated external and internal malformations in embryos. The exposure level of 10,000 mg/kg is characterized by increased rate of total post implantation and embryonic mortality, multiple embryonic developmental defects. At the same time, there were no significant changes in the postnatal development of the offspring compared to the control. In the experiment it was established that the dose of 10 mg/kg is the most inactive dose of DINP at which no signs of teratogenic and embryotropic actions were revealed.

Keywords: diisononyl phthalate; toxicity; embryotoxicity; teratogenicity.

Материал поступил в редакцию 25.08.2017 г.