

ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ ВЕСТНИК

Toxicological Review



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

№ 2 (137), 2016

СОДЕРЖАНИЕ

CONTENTS

Л.А. Коваленко, А.В. Алехнович, Г.Н. Суходолова, К.К. Ильяшенко

ВЛИЯНИЕ ОСТРЫХ ОТРАВЛЕНИЙ ПСИХО-ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИМИ ПРЕПАРАТАМИ НА НЕКОТОРЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ НЕЙРОЭНДОКРИННОЙ СИСТЕМЫ У ДЕТЕЙ И ВЗРОСЛЫХ..... 2

Н.Л. Корягина, Е.И. Савельева, А.И. Уколов, Д.С. Прокофьева, Н.С. Хлебникова, Т.И. Орлова, Е.С. Уколова, А.С. Радилев, Н.В. Гончаров
ВОЗМОЖНОСТИ ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ОСТРОГО ОТРАВЛЕНИЯ ВЕЩЕСТВОМ VR И АНТИДОТНОЙ ТЕРАПИИ КАРБОКСИМОМ..... 8

М.В. Бидевкина, О.В. Бакланова, Т.З. Рысина, И.А. Суетина, О.А. Лопатина, Т.Н. Потапова, М.В. Мезенцева, А.В. Лиманцев, Л.И. Руссу, Ж.П. Алексева

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ТОКСИЧНОСТЬ НЕКОТОРЫХ СПИРТОВ И КОЖНЫХ АНТИСЕПТИКОВ НА ИХ ОСНОВЕ 19

Д.С. Прокофьева, В.И. Шмурак, А.Е. Кривошеин, Е.А. Бодрякова, Н.Г. Войтенко
ЭСТЕРАЗНЫЙ ПРОФИЛЬ КРОВИ МЫШЕЙ ПРИ ОСТРОМ ОТРАВЛЕНИИ 2-(О-КРЕЗИЛ)-4Н-1,3,2-БЕНЗОДИОКСОФOSФОРИН-2-ОКСИДОМ..... 25

К.И. Усов, Т.А. Гуськова, Г.Г. Юшков, А.В. Машанов
ВЛИЯНИЕ ХРОНОБИОЛОГИЧЕСКИХ РИТМОВ НА ТОКСИЧНОСТЬ ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНОГО ПРЕПАРАТА «ИЗОНИАЗИД» В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТА 31

В.Н. Ракитский, С.С. Пашин
НЕЙРОПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ НООПЕПТА НА МОДЕЛИ ФОКАЛЬНОГО ИШЕМИЧЕСКОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ СПИННОГО МОЗГА..... 37

□ Экологическая токсикология

Ж.В. Маркина, Н.А. Айздайчер
СОДЕРЖАНИЕ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПИГМЕНТОВ И РОСТ МИКРОВОДОРОСЛИ PSEUDO-NITZSHIA PUNGENS (BACILLARIOPHYTA) В ПРИСУТСТВИИ БИХРОМАТА КАЛИЯ..... 41

В.И. Ипатова, А.Г. Дмитриева, Т.В. Дрозденко
СРАВНИТЕЛЬНАЯ ТОКСИЧНОСТЬ СОЛЕЙ И НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА ДЛЯ МИКРОВОДОРОСЛИ SCENEDESMUS QUADRICAUDA 45

□ Новые сведения о токсичности и опасности химических и биологических веществ 52

Н.М. Митрохин, М.И. Голубева, И.Н. Разумная, С.А. Фастов, И.С. Фастов
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ДАННЫЕ ПО ИЗУЧЕНИЮ ТОКСИЧНОСТИ И ОПАСНОСТИ АЛЮМОСИЛИКАТНЫХ НАНОТРУБОК..... 52

□ Съезды, конференции, совещания..... 56

□ Новые публикации по токсикологии и смежным дисциплинам 58

L.A. Kovalenko, A.V. Alekhnovich, G.N. Sukhodolova, K.K. Ilyashenko

INFLUENCE OF ACUTE POISONINGS WITH PSYCHOPHARMACOLOGICAL DRUGS ON CERTAIN INDICATORS OF NEUROENDOCRINE SYSTEM IN CHILDREN AND ADULTS..... 2

N.L. Koryagina, E.I. Savelieva, A.I. Ukolov, D.S. Prokofieva, N.S. Khlebnikova, T.I. Orlova, E.S. Ukolova, A.S. Radilov, N.V. Goncharov
POSSIBILITIES OF CHEMICAL TOXICOLOGICAL ANALYSIS IN MODELING ACUTE POISONING WITH VR AND ANTIDOTAL THERAPY USING CARBOXIM 8

M.V. Bidevkina, O.V. Baklanova, T.Z. Rysina, I.A. Suetina, O.A. Lopatina, T.N. Potapova, M.V. Mezentseva, A.V. Limantsev, L.I. Russu, Zh.P. Alekseeva

COMPARATIVE TOXICITY OF CERTAIN ALCOHOLS AND ALCOHOL-BASED SKIN ANTISEPTICS..... 19

D.S. Prokofieva, V.I. Shmurak, A.E. Krivoshein, E.A. Bodryakova, N.G. Voitenko
BLOOD ESTERASE PROFILE IN MICE AT ACUTE INTOXICATION BY 2-(O-CRESYL)-4H-1,3,2-BENZODIOXAPHOSPHORIN-2-OXIDE..... 25

K.I. Usov, T.A. Gus'kova, G.G. Yushkov, A.V. Mashanov
INFLUENCE OF CHRONOBIOLOGICAL RHYTHMS ON TOXICITY OF ANTI-TUBERCULOSIS DRUG «ISONIAZID» UNDER EXPERIMENTAL CONDITIONS..... 31

V.N. Rakitskii, S.S. Pashin
NEUROPROTECTIVE EFFECT OF NOOPEPT SHOWN IN A MODEL OF FOCAL ISCHEMIC DAMAGE TO THE SPINAL CORD 37

□ Ecotoxicology

Zh.V. Markina, N.A. Ayzdaycher
PHOTOSYNTHETIC PIGMENT CONTENT AND GROWTH OF MICROALGAE PSEUDO-NITZSHIA PUNGENS (BACILLARIOPHYTA) IN THE PRESENCE OF POTASSIUM DICHROMATE 41

V.I. Ipatova, A.G. Dmitrieva, T.V. Drozdenko
COMPARATIVE TOXICITY OF SILVER SALTS AND SILVER NANOPARTICLES TO MICROALGA SCENEDESMUS QUADRICAUDA 45

□ News on toxicity and hazard of chemical and biological substances..... 52

N.M. Mitrokhin, M.I. Golubeva, I.N. Razumnaya, S.A. Fastov, I.S. Fastov
EXPERIMENTAL DATA ON INVESTIGATION INTO TOXICITY AND HAZARD OF ALUMINOSILICATE NANOTUBES..... 52

□ Congresses, conferences, meetings..... 56

□ New publications on toxicology and related disciplines 58

УДК 615.9 : 615.214

ВЛИЯНИЕ ОСТРЫХ ОТРАВЛЕНИЙ ПСИХОФАРМАКОЛОГИЧЕСКИМИ ПРЕПАРАТАМИ НА НЕКОТОРЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ НЕЙРОЭНДОКРИННОЙ СИСТЕМЫ У ДЕТЕЙ И ВЗРОСЛЫХ

Л.А. Коваленко¹, А.В. Алехнович²,
Г.Н. Суходолова³, К.К. Ильяшенко⁴

¹Городское Бюджетное Учреждение Здравоохранения Детская Городская Клиническая Больница №13 имени Н.Ф. Филатова, 123995, г. Москва, Российская Федерация

²Федеральное государственное бюджетное учреждение Государственный научный центр Российской Федерации - Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна Федерального медико-биологического агентства, 123182, г. Москва, Российская Федерация

³Государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования Российской Федерации - Академия последипломного образования Министерства здравоохранения Российской Федерации, 123995, г. Москва, Российская Федерация

⁴Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения города Москвы», 120090, г. Москва, Российская Федерация

Стress-реализующая реакция обеспечивает метаболическую основу компенсаторно-приспособительных изменений происходящих в организме человека при воздействии на него каких-либо агрессивных факторов в том числе и химических агентов.

Основную роль в процессах нейроэндокринной регуляции при стрессе играет мозговой слой надпочечников. Щитовидная железа, также как и надпочечники, относится к «классическим» эндокринным железам и играет важную роль в поддержании гомеостаза.

Исследования проведены у 144 пациентов в возрасте от 20 до 45 лет, у 40 детей - в возрасте 11 – 15 и у 45 пациентов от 1 до 5 лет при их поступлении в стационар до начала проведения специализированного лечения.

Проведенные исследования свидетельствуют о том, что в первые часы острых отравлений психофармакологическими препаратами (ПФП), независимо от возраста, в крови больных происходит повышение концентрации кортизола пропорционально тяжести интоксикации, более выраженное у детей раннего возраста. Изменения концентрации гормонов щитовидной железы у всех больных происходят в рамках референтных значений.

Ключевые слова: отравление, психофармакологические препараты, стресс, гормоны.

Введение. В заключительном документе Конференции ООН по окружающей среде и развитию «Международная стратегия химической безопасности. Повестка дня на XXI век» (1992) подчеркивается, что острые химические отравления представляют серьезную угрозу для населения всех стран, которые применяют множество химикатов различного назначения. В связи с тем, что в на-

Коваленко Лилия Анатольевна (Kovalenko Lylia Anatolyevna), кандидат медицинских наук, врач-токсиколог ГБУЗ Детская Городская Клиническая Больница №13 имени Н.Ф. Филатова, 123995, г. Москва, Российская Федерация, lyla72@mail.ru

Алехнович Александр Владимирович (Alekhnovich Alexander Vladimirovich), доктор медицинских наук, заведующий отделом №6, ФГБУ Государственный научный центр Российской Федерации - Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна Федерального медико-биологического агентства, 123182, г. Москва, Российская Федерация, pharmacology71@mail.ru

Суходолова Галина Николаевна (Sukhodolova Galina Nikolaevna), доктор медицинских наук, профессор кафедры, Государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования РОССИЙСКАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ ПОСЛЕДИПЛОМНОГО ОБРАЗОВАНИЯ Министерства здравоохранения Российской Федерации, 123995, г. Москва, Российская Федерация, toxi-kafe@mail.ru

Ильяшенко Капитолина Константиновна (Ilyashenko Kapitolina Konstantinovna), доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник отделения острых отравлений; Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения города Москвы», 120090, г. Москва, Российская Федерация, toxi-6@rambler.ru

шей стране рынок разнообразной химической продукции недостаточно эффективно контролируется медицинскими учреждениями, увеличиваются контакты населения с растущим ассортиментом химических веществ бытового и иного назначения, что приводит к распространению острых отравлений химической этиологии [1]. Поэтому вопросы касающиеся развития и особенностей течения болезней химической этиологии, а также вопросы их рациональной, максимально эффективной и экономически обоснованной терапии не теряют своей актуальности.

Отечественным патофизиологом А.Д. Сперанским было установлено, что организм на огромное количество повреждающих раздражителей отвечает относительно небольшим набором стандартных форм реагирования. Одной из таких форм является стрессовая реакция. По своей биологической сущности стресс, согласно теории Г. Селье, – это, прежде всего, общая неспецифическая адаптивная реакция организма, возникающая под влиянием факторов внешней или внутренней среды, способных вызвать нарушение гомеостаза [2].

Стресс-реализующая реакция обеспечивает метаболическую основу компенсаторно-приспособительных изменений происходящих в организме человека при воздействии на него каких-либо агрессивных факторов в том числе и химических агентов [3, 4, 5]. При этом ведущая роль в реализации стресса принадлежит гипоталамо-ретикулярным структурам головного мозга. Возбуждение последних проявляется в качестве первичной реакции на конфликтную ситуацию, на основе которой уже вторично формируются нарушения деятельности функциональных систем висцерального или гомеостатического уровня [6, 7, 8, 2]. В свою очередь гипоталамус через систему регуляции «Гипофиз – щитовидная железа – надпочечники» осуществляет интеграцию всех адаптационных процессов.

Многочисленными исследованиями отечественных и зарубежных ученых было показано важное значение реакции стресс-реализующих систем организма человека на течение и исход многих как острых, так и хронических заболеваний [9, 10, 11]. Острые отравления химической этиологии не являются исключением. Знания особенностей адаптационных механизмов, развивающихся в ответ на взаимодействие токсиканта с организмом человека, позволяет оптимизировать качественный состав и объем интенсивной терапии.

Учитывая то обстоятельство, что в структуре острых экзотоксикозов как у детей, так и взрослых [1] ведущее место занимают отрав-

ления психофармакологическими препаратами, целью настоящего исследования явилось изучение нарушений нейроэндокринной системы у взрослых и детей в первые часы острой химической травмы.

Материалы и методы исследования. Исследования проведены у 144 пациентов в возрасте от 20 до 45 лет, у 40 детей – в возрасте 11 – 15 и у 45 пациентов от 1 до 5 лет при их поступлении в стационар до начала проведения специализированного лечения.

На основании принятых в клинической токсикологии классификаций по степени тяжести пациенты были разделены на 3 группы: 1 группа – отравление легкой степени, 2 группа – отравление средней степени тяжести и 3 группа – отравление тяжелой степени.

Определение концентрации кортизола, ТТГ и T_4 в сыворотке крови больных проводили радиоиммунным методом с использованием набора реагентов Immunotech (Чехия) CIS (Франция). Регистрацию и обработку результатов проводили на гамма-счетчике Clinigramma производства фирмы LKB (Швеция).

Статистическая обработка данных проводилась с применением пакета программ STATISTICA 7.0 (StatSoft.Inc.). Описательная статистика признака включала среднее значение (M) и ошибку средней величины (m). Достоверность различий оценивали с помощью t -критерия Стьюдента. Статистически значимыми считались различия при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение. Центральная нервная система представляет собой орган-мишень при попадании ПФП в организм человека, взаимодействие с которым является основным пусковым механизмом для развития острой химической болезни и запуска стрессовой реакции. Выраженность нарушения сознания у пострадавших определяли по шкале комы Глазго (табл. 1) [13].

Данные таблицы 1 демонстрируют, что уровень нарушения сознания у детей и взрослых в одноименных группах не имел значимых различий, т.е. по тяжести интоксикации они были сопоставимы.

Основную роль в процессах нейроэндокринной регуляции при стрессе играет мозговой слой надпочечников [14, 15, 16].

В таблице 2 представлены данные о содержании кортизола в сыворотке крови больных разного возраста в зависимости от степени тяжести отравления.

Как следует из данных, представленных в таблице 2, у детей обеих возрастных групп уровень кортизола не зависимо от тяжести отравления превышал верхнюю границу нормы. Так, в группе детей 1 – 5 лет средние значения

Таблица 1

**Уровень нарушения сознания у больных в зависимости от степени тяжести
(баллы по шкале Глазго)**

Возраст больных	Степень тяжести отравления		
	Легкая	Средняя	Тяжелая
1 - 5 лет	13,5±0,8 n=15	9,1± 0,7 n=15	5,9± 0,9 n=15
11 - 15 лет	13,4± 0,7 n=10	8,9± 0,6 n=15	6,0±1,00 n=15
20 - 45 лет	14,3±0,06 n=49	8,2±0,04 n=47	5,2±0,02 n=48

Таблица 2

**Концентрация кортизола в сыворотке крови пациентов разного возраста при острых отравлениях
ПФП в зависимости от степени тяжести отравления (M±m)**

Возраст	Норма (нмоль/л)	Тяжесть отравления		
		Легкая	Средняя	Тяжелая
1 - 5 лет	200 - 700	1020,4±56,8 n=15	1658±73,1 ¹ n=15	2192,5±148,4 ^{2,3} n=15
11 - 15 лет	200 - 700	912±62,3 n=10	992±67,7 n=15	1206±147,1 ³ n=15
20 - 45 лет	150-660	339±2 n=49	423±6 ¹ n=47	558±6 ^{2,3} n=48

Примечание: ¹ - p<0,05 между значениями показателя пациентов средней и легкой тяжести; ² - p<0,05 между значениями показателей пациентов тяжелой и средней степени.

³- p<0,05 между значениями показателей пациентов тяжелой и легкой степени.

кортизола при легкой степени отравления были выше нормы в 1,3 раза. При среднетяжелой и тяжелой форме отравления кортизол в сыворотке крови больных повышался в 2,4 и 3,1 раза соответственно. У детей старше 11 лет была выявлена аналогичная закономерность. Однако степень увеличения этого показателя была менее выражена по сравнению с пациентами раннего возраста. В группе взрослых больных также имело место повышение уровня кортизола в сыворотке крови, при этом оно происходило в пределах референтных значений. Ана-

логичные данные были получены и другими исследователями при изучении уровня кортизола в крови взрослых больных с urgentными состояниями [17, 18]. Из изложенного выше следует, что при острых отравлениях ПФП независимо от возраста по мере нарастания интоксикации происходит прогрессивное увеличение концентрации кортизола в крови.

Полученные нами данные не противоречат результатам исследований гормонального профиля у пациентов с различной патологией (сепсис, термическая и механическая травма,

Таблица 3

Концентрация тиреотропных гормонов в сыворотке крови у детей при острых отравлениях ПФП в зависимости от степени тяжести отравления ($M \pm m$)

Возраст	Показатель / Норма	Тяжесть отравления		
		Легкая	Средняя	Тяжелая
1 - 5 лет	ТТГ 0,2-3,2 мМЕ/л	2,05±0,12 n=10	2,70±0,11 ¹ n=15	3,72±0,35 ^{2,3} n=15
	T ₄ 94 - 194 нмоль/л	207,8±40,60	187,7±2,18 ¹	160,0±11,55 ^{2,3}
11 - 15 лет	ТТГ 0,2-3,2 мМЕ/л	0,79±0,26 n=15	1,51±0,29 ¹ n=10	1,66±0,18 n=10
	T ₄ 94 - 194 нмоль/л	198,8±14,72	190,7±9,59	170,0±12,25 ^{2,3}

Примечание: ¹ - $p < 0,05$ между значениями показателя пациентов средней и легкой тяжести; ² - $p < 0,05$ между значениями показателей пациентов тяжелой и средней степени.

³- $p < 0,05$ между значениями показателей пациентов тяжелой и легкой степени.

Таблица 4

Концентрация тиреотропных гормонов в сыворотке крови взрослых пациентов с острыми отравлениями ПФП ($M \pm m$)

Показатель	Норма	Тяжесть отравления		
		Легкая n=49	Средняя n=47	Тяжелая n=48
ТТГ	0,17-4,0 мМЕ/л	1,2±0,01	1,07±0,031	0,88±0,022,3
T ₄	11,5-23,2 пмоль/л	19,3±0,25	19,3±0,37	19,0±0,38

Примечание: ¹ - $p < 0,05$ между значениями показателя пациентов средней и легкой тяжести; ² - $p < 0,05$ между значениями показателей пациентов тяжелой и средней степени

³- $p < 0,05$ между значениями показателей пациентов тяжелой и легкой степени.

в том числе и черепно-мозговая) и демонстрирует независимость реакции эндокринной системы от этиологического фактора, вызывающего стресс [19, 20, 21, 10, 11, 22]. Наряду с этим было выявлено, что у детей младшего возраста продукция кортизола была выше, чем в одноименных по степени тяжести группах детей старшего возраста и взрослых больных. По

нашему мнению, этот факт можно объяснить возрастными особенностями регуляции вегетативной нервной системы. Известно, что у детей раннего возраста имеет место более высокий тонус ее симпатического отдела [23, 24, 25].

Наряду с этим имеются сведения о развивающейся у них резкой гиперсимпатикотонии в ответ на острый химический стресс [26, 27]. Это,

вероятно, дополнительно стимулирует выработку кортизола корой надпочечников.

Еще одной немаловажной осью в реализации реакции стресса, обеспечивающих метаболическую основу компенсаторно-приспособительных изменений, являются тиреоидные гормоны. Щитовидная железа, также как и надпочечники, относится к «классическим» эндокринным железам и играет важную роль в поддержании гомеостаза [4, 28]. При исследовании показателей функциональной активности щитовидной железы у пациентов с острыми отравлениями ПФП в детском возрасте мы получили следующие данные (табл. 3)

В группе детей 1 – 5 лет при отравлении легкой степени отмечалось повышение уровня в крови ТТГ и превышало верхнюю границу на 13,9%. При отравлении средней и тяжелой степени происходило его снижение, но в пределах нормы. Концентрация тироксина снижалась

по мере нарастания тяжести интоксикации. У детей старше 11 лет в целом прослеживалась аналогичная картина.

Таблица 4 демонстрирует, что у пациентов в возрасте 20 – 45 лет колебания концентрации ТТГ и Т₄ происходили в пределах референтных значений.

Из полученных данных следует, что при острой химической травме у всех пострадавших происходят изменения функциональной активности щитовидной железы в пределах физиологической нормы.

Заключение. Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют о том, что в первые часы острых отравлений психофармакологическими препаратами, независимо от возраста, в крови больных происходит повышение концентрации кортизола пропорционально тяжести интоксикации, более выраженное у детей раннего возраста. Изменения концентрации гормонов щитовидной железы у всех больных происходят в рамках референтных значений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Медицинская токсикология: национальное руководство. Под ред. Е.А. Лужникова М. ГЭОТАР-Медиа. 2012г. 928с.
2. Селье Г. Очерки об адапционном синдроме – М.: Медгиз. 1960.
3. Калинин А. П., Неретин В. Я., Котов С. В. Гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая система и цереброваскулярная патология: современное состояние проблемы. Журн. невропатологии и психиатрии им. С. С. Корсакова. – 1991. – 91, N1 : 0044-4588. – С. 134-138. – Библиогр.: с. 137-138.
4. Chioloro R., Lemarchand-Beraud T., Shultz Y., deTribulet N., Bayer-Berger M., Freeman J. Thyroid function in severely traumatized patients with or without head injury. Acta Endocrinologia (Copenhagen) 117 (1) 80-86, 1988.
5. Интенсивная терапия. Реанимация. Первая помощь: Учебное пособие / Под ред. В.Д. Малышева. – М.: Медицина. – 2000. – 464 с.: ил. – Учеб. лит. Для слушателей системы последипломного образования. – ISBN 5-225-04560-X).
6. Судаков К. В. Теория функциональных систем. М., Изд-во Мед. музей, 1996, 95с.
7. Меерсон Ф. Адаптация, стресс, про-филактика / Ф.З. Меерсон. -М.: Наука, 1981.-279 с.,
8. Павлов С. Е. Неспецифические адаптационные реакции организма и медицинская реабилитация /С.Е. Павлов в сб.: «Актуальные вопросы медицинской реабилитации в со-временных условиях» – М.: 1999 – С. 27-31.
9. Бобков А. И., Брехов Е. И., Сухоруков В. Н. Стрессовые нарушения гормональной регуляции и метаболизма при острых воспалительных заболеваниях брюшной полости, осложненных развитием перитонита. Хирургия. 1992. №4. С. 94-100.
10. Скворцова В. И., Платонова А. И., Островцев И. В., Журавлев Е. Ю., Чиграй З. А., Ефремова Н. М., Огарева Н. В. Влияние гормонов стресс-реализующей системы на течение острого периода ишемического инсульта. Журнал неврологии и психиатрии № 4. 2000. С. 20-27.
11. Childers M.K., Rupright J., Jones P.S. Assessment of neuroendocrine disfunction following traumatic brain injury. Brain Inj 1998 Jun; 12(6):517-237.
12. Медицинская токсикология: национальное руководство/Под ред. Е.А.Лужникова. - М.: ГЭОТАР-Медиа,2012.-920с.
13. Teasdale G, Jennett B. Assessment of coma and impaired consciousness. A practical scale. Lancet. 1974; 2:81-84.
14. Филаретов А. А. Принципы и механизмы регуляции гипофизарноадренортикарной системы. Л.:Наука, 1987. 165с.
15. Reinck M.A., Wurth A.B. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis in critical illness: response to dexamethasone and corticotropin-releasing hormone. Journal of clinical endocrinology and metabolism. 1993. – Vol. 77, № 3. – P. 5156.
16. Miller DB, O'Callaghan JP, Miller DB, et al. Neuroendocrine aspects of the response to stress. Metab Clin Exp. 2002;51:5-10.
17. Mark P.E., Zaloga G.P. Adrenal insufficiency in the critically ill: a new look at an old problem. Chest 2002; 122 (5):1784-96.
18. Cooper M.S., Stewart P.M. Corticosteroid insufficiency in acutely ill patients. N Engl J Med. 2003; 348:727-734.
19. Arem R., Ghust H., Ellerhorst J., Comstock J.P. Clin Biochem 1997; 30 (5): 419- 424.
20. Виру А.А. Динамика реакции гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы при стрессе // Успехи современной биологии. 1979. – Т. 87. – Вып. 2.-С. 271-286.
21. Харкевич Н.Г. Нейроэндокринные нарушения у больных с сотрясением головного мозга // Советская медицина. 1980. – № 10. – С. 83-84.
22. Childers M.K., Rupright J., Jones P.S. Assessment of neuroendocrine disfunction following traumatic brain injury. Brain Inj 1998 Jun; 12(6):517-237
23. Зависимость состояния симпатико-адреналовой и гипоталамо-гипофизарно-адренортикарной систем от тяжести травматического поражения головного мозга / А-Э.А. Каасик, Л.Э. Кыйв, А.А. Паю [и др.] Вопр. нейрохирургии. – 1994. – № 1. – С. 26 – 29.)
24. Леонтьева М. Н. Анатомия и физиология детского организма/ М.Н. Леонтьева. – М.: Просвещение, 1996. – 124с.
25. Сапин М. Р. Анатомия и физиология детей и подростков: Учеб. пособие для студ.пед.вузов / М.Р. Сапин, З.Г. Брыскина. – 4-е изд., перераб.и доп. – М.: Издательский центр «Академия», 2005. – 432с.
26. Сапин М. Р. Анатомия и физиология человека (с возрастными особенностями детского организма: учеб. пособие/ М.Р. Сапин, В.И. Сивоглазов. – М.: Академия, 2004. – 438с.).
27. Страхов С. И. Особенности адаптации компенсаторных функций организма при острых отравлениях психотропными средствами у детей. / С.И. Страхов Автореф. дисс. канд. мед. наук. М. – 2000.
28. Суходолова Г. Н. Особенности острых отравлений лекарствами у детей./ Г.Н. Суходолова Ленкии для практикующих врачей, Российский Национальный конгресс «Человек и лекарство» М.: 1998. – с. 59-65.
29. Chioloro R.L., Lemarchand-Beraud T., Schutz Y. Thyroid function in severely traumatized patients with or without head injury. Acta Endocrinol. 1988 Jan; 117 (1): 80-6., 21.
30. Chioloro, R. Endocrine response to brain injury / R. Chioloro, M. Berger // New Horizons. – 1994. – Vol. 17, N 1. – P. 25 – 29.].

REFERENCES:

1. Medical toxicology: national management. Under the editorship of E.A. Luzhnikov M. GEOTAR-media. 2012 928s. (in Russian).
2. Selye G. Sketches about an adaptation syndrome – M.: Medgiz. 1960. (in Russian).
3. Kalinin A. P., Neretin V. Ya., Kотов S. V. Gipotalamo – hypophysial nadpocheknikovaya system and tserebrovaskulyarny pathology: current state of a problem. Zhurn. neuropathology and psychiatry of S. S. Korsakov. – 1991. – 91, N1: 0044-4588. – P. 134-138. – Bibliogr.: p. 137-138. (in Russian).
4. Chioloro R., Lemarchand-Beraud T., Shultz Y., deTribulet N., Bayer-Berger M., Freeman J. Thyroid function in severely traumatized patients with or without head injury. Acta Endocrinologia (Copenhagen) 117 (1) 80-86, 1988.
5. Intensive therapy. Reanimation. First aid: The manual / Under the editorship of V.D. Malyshev. – M.: Medicine. – 2000. – 464 pages: silt. – Studies. litas. For listeners of system of postdegree education. – ISBN 5-225-04560-X). (in Russian).
6. K.V's pike perches. Theory of functional systems. M, Publishing house Medical museum, 1996, 95s. (in

- Russian).
7. Meerson F. Adaptation, stress, prevention / F.Z. Meerson. – M.: Science, 1981.-279 p. (in Russian).
8. Pavlov S. E. Nonspecific adaptation reactions of an organism and medical rehabilitation / Page E. Pavlov on Saturday.: «Topical issues of medical rehabilitation in modern conditions» – M.: 1999 – P. 27-31. (in Russian).
9. Bobkov A.I., Brekhov E. I., Sukhorukov V. N. Stressful violations of hormonal regulation and a metabolism at the sharp inflammatory diseases of an abdominal cavity complicated by development of peritonitis. Surgery. 19No. P. 94-100 (in Russian)..
10. Skvortsova V. I., Platonova A.I., Ostrovstev I. V., Zhuravlev E. Yu., Z. A., Efremov N. M., Ogarev N. V. Chigray. Influence of hormones of stressrealizuyushchy system on a current of the sharp period of an ischemic stroke. Magazine of neurology and psychiatry No. 20 P. 20-27. (in Russian).
11. Childers M.K., Rupright J., Jones P.S. Assessment of neuroendocrine disfunction following traumatic brain injury. Brain Inj 1998 Jun; 12(6):517-237.
12. Medical toxicology: the national management / Under the editorship of E.A.Luzhnikova. – M.: GEOTAR-media, 2012. – 920s.
13. Teasdale G, Jennett B. Assessment of coma and impaired consciousness. A practical scale. Lancet. 1974; 2:81–
14. Filaretov A.A. Principles and mechanisms of regulation of gipofizarnoadrenokortikalny system. L of a.:nauk, 19165s (in Russian)..
15. Reinck M.A., Wurth A.B. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis in critical illness: response to dexamethasone and corticotropin-releasing hormone. Journal of clinical endocrinology and metabolism. 1993. – Vol. 77, No. 3. – P. 5156.
16. Miller DB, O'Callaghan JP, Miller DB, et al. Neuroendocrine aspects of the response to stress. Metab Clin Exp. 2002; 51:5-
17. Marik P.E., Zaloga G.P. Adrenal insufficiency in the critically ill: new look at an old problem. Chest 2002; 122 (5):1784-96.
18. Cooper M.S., Stewart P.M. Corticosteroid insufficiency in acutely ill patients. N Engl J Med. 2003; 348:727-734.
19. Arem R., Ghust H., Ellerhorst J., Comstock J.P. Clin Biochem 1997; 30 (5): 419-424.
20. Viru A.A. Dynamics of reaction гипоталамо – гипорфизаль надпочечниковой systems at a stress//Achievements of modern biology. 1979. – Т. 87. – Вып. 2. – P. 271-286. (in Russian).
21. Harkevich N. G. Neuroendocrine violations at patients with brain concussion//the Soviet medicine. 1980. – No. 10. – P. 83-84. (in Russian).
22. Childers M.K., Rupright J., Jones P.S. Assessment of neuroendocrine disfunction following traumatic brain injury. Brain Inj 1998 Jun; 12(6):517-237
23. Dependence of a state simpatiko-adrenalovy and гипоталамо – гипорфизаль адренкортикальной systems from weight of traumatic defeat of brain / A-E.A. Kaasik, L.E. Kyuv, to A.A. Pai [i dr.] Wopr. neurosurgery. – 1994. – No. 1. – P.26 – 29. (in Russian.)
24. Leontyeva of M. N. Anatomiya and physiology of a children's organism / M. N. Leontyeva. – M.: Education, 1996. – 124s. (in Russian).
25. Sapin M.R. Anatomy and physiology of children and teenagers: Studies. a grant for stud.ped.vuz / Masculine Sapin, Z.G. Bryskina. – 4 prod., pererab. akademiya – M.: Publishing center «Akademiya», 2005. – 432s. (in Russian).
26. Sapin M.R. Anatomy and human physiology (with age features of a children's organism: studies. grant / Masculine Sapin, V. I. Sivoglazov. – M.: Academy, 2004. – 438s.). (in Russian).
27. Strakhov S. I. Osobennosti of adaptation of compensatory functions of an organism at sharp poisonings with psychotropic drugs at children. / S. I. Strakhov Avtoref. yew. edging. medical sciences. M – 2000. (in Russian).
28. Sukhodolova G. N. Features of sharp poisonings with drugs at detey./G. N. Sukhodolova of Lecture for practical doctors, the Russian National congress «The person and medicine» M.: 1998. – page 59-65. (in Russian).
29. Chiolero R.L., Lemarchand-Beraud T., Schutz Y. Thyroid function in severely traumatized patients with or without head injury. Acta Endocrinol. 1988 Jan; 117 (1): 80-6., 21.
30. Chiolero, R. Endokrine response to brain injury/R. Chiolero, M. Berger//New Horizons. – 1994. – Vol. 17, N 1. – P. 25 – 29.]

L.A. Kovalenko¹, A.V. Alekhnovich², G.N. Sukhodolova³, K.K. Ilyashenko⁴

INFLUENCE OF ACUTE POISONINGS WITH PSYCHOPHARMACOLOGICAL DRUGS ON CERTAIN INDICATORS OF NEUROENDOCRINE SYSTEM IN CHILDREN AND ADULTS

¹ N.F. Filatov Children's City Clinical Hospital No. 13, 123995, Moscow, Russian Federation

² A.I. Burnazyan Federal Medical Biophysical Center, Federal Medical and Biological Agency, 123182, Moscow, Russian Federation

³ Russian Medical Academy for Post-Graduate Education, 123995 Moscow, Russian Federation

⁴ N. V. Sklifosovsky Research Institute of Emergency Care, 120090 Moscow, Russian Federation

The stress-realizing reaction provides a metabolic basis of compensatory and adaptive changes occurring in the human body under the impact of aggressive factors including chemical agents. The main role in neuroendocrine regulation of a stress is played by the brain layer of adrenal glands. The thyroid gland, as well as adrenal glands also belongs to «classical» endocrine glands and plays an important role in maintenance of homeostasis. Researches were conducted in 144 patients aged from 20 to 45, in 40 children at the age of 11 to 15 and in 45 patients from 1 to 5 year old admitted to hospital before a special care was performed. The conducted researches showed that during the first hours after acute poisonings with psychopharmacological preparations, irrespective of age, cortisol concentration increased in patients blood proportionally to the severity of intoxication which was more expressed in children at early age. Concentration changes in the thyroid gland hormones in all patients happened within reference values.

Keywords: poisoning, psychopharmacological preparations, stress, hormones.

Материал поступил в редакцию 29.03.2016 г.

УДК 543.51 :615.917

ВОЗМОЖНОСТИ ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ОСТРОГО ОТРАВЛЕНИЯ ВЕЩЕСТВОМ VR И АНТИДОТНОЙ ТЕРАПИИ КАРБОКСИМОМ

Н.Л. Корягина, Е.И. Савельева, А.И. Уколов, Д.С. Прокофьева, Н.С. Хлебникова, Т.И. Орлова, Е.С. Уколова, А.С. Радилов, Н.В. Гончаров

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

Исследовано влияние реактиватора холинэстераз карбоксима на возможность определения маркеров VR (О-изобутил-S-(2-диэтиламиноэтил)метилтиофосфоната) в биопробах, полученных в остром эксперименте *in vivo* после отравления крыс в дозе $2 \times 0,4LD_{50}$ с интервалом 1 час. Установлено, что ацетилхолинэстераза (АХЭ) является более чувствительным биомаркером по сравнению с бутирилхолинэстеразой (БХЭ) плазмы крови. Использование карбоксима приводит к реактивации АХЭ в течение 3-х часов после отравления, тогда как в отсутствие терапии реактивация происходит в течение 3-х дней. Регенерация фосфорорганических отравляющих веществ (ФОВ) из состава белковых аддуктов плазмы крови с помощью фторид-иона в условиях эксперимента была возможна в течение 7 дней независимо от применения антидота. Влияние реактиватора на экскрецию продуктов гидролиза VR оказалось значительным. Через сутки после отравления и введения карбоксима О-изобутилметилфосфонат (ИБМФК) был идентифицирован в моче на уровне 17 нг/мл, в то время как в образцах мочи животных, не получавших реактиватор, на уровне 7,4 нг/мл; через трое суток ИБМФК был определен только в моче животных, не получавших антидот, на уровне 1 нг/мл. Также установлено, что содержание свободных и этерифицированных жирных кислот в плазме крови животных, не получавших антидот, становится максимальным на 7 сутки после отравления и, таким образом, может дополнить комплекс токсикодинамических показателей отравления VR.

Ключевые слова: химико-токсикологический анализ, фосфорорганические отравляющие вещества, вещество VR, маркеры, хроматомасс-спектрометрия, антидотная терапия.

Корягина Надежда Леонидовна (Koryagina Nadezhda Leonidovna), кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории аналитической токсикологии ФГУП «НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России, 188663, Ленинградская область, Всеволожский район, г.п. Кузьмоловский, Российская Федерация, koryagina@rihophe.ru

Савельева Елена Игоревна (Savelieva Elena Igorevna), доктор химических наук, заведующий лабораторией аналитической токсикологии ФГУП «НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России, 188663, Ленинградская область, Всеволожский район, г.п. Кузьмоловский, Российская Федерация, savelieva@rihophe.ru

Уколов Антон Игоревич (Ukolov Anton Igorevich), кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории аналитической токсикологии ФГУП «НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России, 188663, Ленинградская область, Всеволожский район, г.п. Кузьмоловский, Российская Федерация, antonukolov@gmail.com

Прокофьева Дарья Станиславовна (Prokofieva Darya Stanislavovna), кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной токсикологии и экспериментальной терапии ФГУП «НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России, 188663, Ленинградская область, Всеволожский район, г.п. Кузьмоловский, Российская Федерация, darja-p1@yandex.ru

Хлебникова Наталия Семеновна (Khlebnikova Nataliya Semenovna), кандидат химических наук, руководитель международного отдела, старший научный сотрудник лаборатории общей токсикологии и гигиенического нормирования ФГУП «НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России, 188663, Ленинградская область, Всеволожский район, г.п. Кузьмоловский, Российская Федерация, khlebnikova@rihophe.ru

Уколова Елена Сергеевна (Ukolova Elena Sergeevna), кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории аналитической токсикологии ФГУП «НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России, 188663, Ленинградская область, Всеволожский район, г.п. Кузьмоловский, Российская Федерация

Орлова Татьяна Игоревна (Orlova Tatiana Igorevna), научный сотрудник лаборатории аналитической токсикологии ФГУП «НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России, 188663, Ленинградская область, Всеволожский район, г.п. Кузьмоловский, Российская Федерация

Радилов Андрей Станиславович (Radilov Andrey Stanislavovich), доктор медицинских наук, профессор, заместитель директора по научной работе, заведующий отделом токсикологии ФГУП «НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России, 188663, Ленинградская область, Всеволожский район, г.п. Кузьмоловский, Российская Федерация, radilov@rihophe.ru

Гончаров Николай Васильевич (Goncharov Nikolay Vasilievich), доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории аналитической токсикологии ФГУП «НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России, 188663, Ленинградская область, Всеволожский район, г.п. Кузьмоловский, Российская Федерация, ngoncharov@gmail.com

Введение. Фосфорорганические отравляющие вещества (ФОВ) являются нервно-паралитическими ядами. Основным механизмом токсического воздействия ФОВ заключается в ингибировании холинэстераз (ХЭ), осуществляющих гидролиз ацетилхолина. Вещества группы V: О-этил-S-(2-диизопропиламиноэтил)метилтиофосфонат, VX, CAS: 50782-69-9 и О-изобутил-S-(2-диэтиламиноэтил)метилтиофосфонат, VR, CAS: 159939-87-4, являются наиболее токсичными из всех химических соединений, созданных человеком при разработке химического оружия. Структурные формулы приведены на рисунке 1.

Возможность установления факта отравления ФОВ методами химико-токсикологического анализа определяется реальными концентрациями маркеров этих ФОВ в биопробах на момент исследования и возможностями методики их достоверной идентификации. Методами биохимического анализа регистрируют снижение каталитической активности ХЭ крови [1,2,3], методами химического анализа определяют ксенометаболиты – продукты метаболизма ФОВ (низкомолекулярные продукты гидролиза, белковые аддукты) [4,5,6,7]. При оценке метаболических последствий отравлений фиксируют изменения концентраций биогенных веществ, например, маркеров метаболизма липидов [8].

В случае поражения ФОВ антидотная терапия (введение холинолитика, реактиватора или их комбинации), с большой вероятностью, будет проведено раньше, чем будут отобраны биопробы для анализа. Антидотами при поражении ФОВ обычно являются представители двух групп веществ: холинолитики и реактиваторы ХЭ [9]. Наиболее известный препарат первой группы – атропин. В больших дозах он обладает не только периферическим, но и центральным М-холинолитическим действием, а также проявляет дофаминоблокирующий эффект [10]. В качестве реактиваторов ХЭ применяют дипироксим, токсогонин, обидоксим и др. [11]. Принцип реактивации заключается в разрыве химической связи между ФОВ и ХЭ, в результате чего восстанавливается структура ХЭ и её функция. Кроме того, реактиваторы ХЭ обладают Н-холинолитическими свойствами, что обосновывает их применение в сочетании с М-холинолитиками [12]. Антидотная терапия может изменить показатели токсикокинетики ФОВ и их метаболитов, что необходимо учитывать при проведении химико-токсикологического анализа и интерпретации его результатов.

Целью настоящего исследования являлась оценка влияния антидотной терапии на возможности химико-токсикологического анализа ксенометаболитов и биогенных маркеров

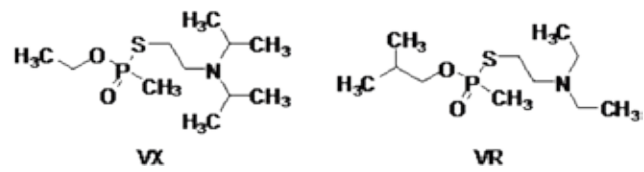


Рис. 1. Структурные формулы фосфорорганических отравляющих веществ группы V

воздействия ФОВ при моделировании острого отравления животных (крыс) веществом VR с применением реактиватора карбоксима. В качестве маркеров рассматривали: 1) активность ХЭ крови; 2) О-изобутилметилфторфосфонат (VR-G) – фторпроизводное вещества VR, регенерированного из белковых аддуктов с помощью фторид-иона в плазме крови; 3) О-изобутилметилфосфонат – продукт гидролиза вещества VR в моче; 4) биогенные компоненты плазмы крови – свободные (СЖК) и этерифицированные жирные кислоты (ЭЖК).

Материалы и методы исследования.

ГСО и другие материалы.

VR (ГСО 8249-2004), карбоксим (раствор для внутримышечного введения 150 мг/мл, V03AB), О-изобутилметилфосфонат и его дейтерированный аналог (синтезирован в НИИ химии Санкт-Петербургского Государственного университета), ацетонитрил (ТУ 6-09-5497-91), ацетат натрия (ГОСТ 199-78), фильтры Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Units (10k, Millipore), муравьиная кислота (Fluka, кат. № 56302), калий фтористый 2-водный (CAS 7789-23-3, ГОСТ 20848-75), ацетат натрия (ГОСТ 199-78), уксусная кислота (ГОСТ 19814-74), дихлорметан (Supelco, кат. № 1.06044.2500), этилацетат (ГОСТ 22300-76), 10 мМ натрий-калиевый фосфатный буферный раствор (137 мМ NaCl и 2,7 мМ KCl), pH 7.4 (ФБ). Картриджи для твердофазной экстракции (ТФЭ) – OASIS HLB, 60 мг (Waters, кат. № WAT094226) и Supelclean LC-18, 500 мг (Supelco, кат. № 57012); многоканальный вакуумный коллектор для ТФЭ (Supelco, кат. № 57030-U), вортекс (SkyLine, ELM1), ультразвуковая ванна (Elmasonic S30H, ELMA), термостатируемый шейкер (SkyLine ST-3L, ELM1).

Объекты анализа

Образцы плазмы крови и мочи лабораторных животных, полученные в эксперименте *in vivo*. Условия содержания экспериментальных животных соответствовали нормативному документу «Правила лабораторной практики в Российской Федерации (GLP)» (утв. Приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации 19.06.2003 N 267).

Описание токсикологического эксперимента

В эксперименте были использованы 2 группы белых беспородных крыс со средней массой тела 270 ± 24 г по 12 особей в каждой. Животным 1-й группы вводили VR подкожно, дважды по 0.4 ЛД_{50} с интервалом 1 час (суммарная введенная доза составила $9,6 \text{ мкг/кг}$); животным 2-й группы вводили воду (контроль). Сразу после первого введения VR половине животных каждой группы был введен подкожно карбоксим в дозе 10 мг/кг из расчета 100 мкл/100 г веса тела. Отбор проб крови производили через 3 часа, 1, 3, 7 и 30 суток, отбор мочи – через 1, 3 и 7 суток после начала токсикологического эксперимента.

Оборудование и условия проведения инструментального анализа

1. Определение активности АХЭ и БХЭ биохимическими методами

1.1 Выделение мембран эритроцитов из цельной замороженной крови

Образцы цельной крови перед анализом размораживали при $+4^\circ\text{C}$. К аликвоте цельной крови объемом 0.25 см^3 добавляли 1 см^3 ФБ. Полученную взвесь суспендировали и центрифугировали в течение 30 мин при $20\,000 \text{ g}$ и $+4^\circ\text{C}$.

Аликвоту надосадочной жидкости объемом $0,2 \text{ см}^3$ вносили в лунки 96-луночного планшета в тройном повторе для каждой пробы. Измерения абсорбции проводили при длине волны 540 нм (максимум поглощения гемоглобина).

Для отмывки мембран эритроцитов к осадку добавляли $1,0 \text{ см}^3$ ФБ. Образец подвергали ультразвуковой (УЗ) обработке в течение 30 мин в режиме непрерывного излучения после чего перемешивали на вортексе в течение 5 мин. Надосадочную жидкость отбрасывали, и к осадку вновь добавляли ФБ. Процедуру отмывки повторяли до тех пор, пока надосадочная жидкость не становилась практически бесцветной. Полученный осадок суспендировали в $1,0 \text{ мл}$ ФБ в УЗ-ванне в течение 10 мин.

1.2 Измерение активности АХЭ мембран эритроцитов

Аликвоту суспензии объемом $0,2 \text{ см}^3$ помещали в лунки планшета в тройном повторе для каждой пробы. В качестве холостой пробы использовали ФБ. Планшет нагревали 3 мин на шейкере при 37°C . В пробы вносили по $0,08 \text{ см}^3$ проявочной смеси, состоящей из 9 объемных частей раствора $5,5'$ -дитиобис-(2-нитробензойной кислоты) в ФБ (0.8 мг/см^3) и одной объемной части раствора ацетилтиохолина в ФБ (20 мг/см^3). Планшет помещали в планшетный фотометр, поддерживающий температуру 37°C , на 2 мин, после чего проводили считывание абсорбции опытных проб против холостой пробы при длине волны 405 нм в кинетическом режиме. Было выполнено два измерения с интервалом в 10 мин.

Из значения абсорбции опытных проб второго считывания вычитали соответствующие им значения абсорбции опытных проб первого считывания. За 100% активность АХЭ принимали активность АХЭ в пробах, отобранных у животных контрольной группы.

1.3 Определение активности БХЭ в плазме крови

Образцы плазмы крови разбавляли в 20 раз с помощью ФБ и встряхивали в течение 5 мин в устройстве для встряхивания проб. Аликвоту образца объемом 0.16 см^3 помещали в лунки 96-луночного планшета в тройном повторе для каждой пробы. В качестве холостой пробы использовали ФБ. Измерения проводили в условиях, описанных в п. 1.2.

1.4 Статистическая обработка данных

Статистическую обработку полученных данных ($n \geq 6$), выполняли с помощью программного обеспечения GraphPad Prizm 5.0. Перед анализом данных проводили проверку нормальности их распределения (тест Колмогорова–Смирнова). Поскольку данные подчинялись нормальному распределению, для дальнейшей обработки использовали параметрический однофакторный дисперсионный анализ. Для сравнения экспериментальных данных с контрольными значениями использовали тест Dunnett. Критический уровень значимости (P) при проверке статистических гипотез принимали равным 0.05. В случае небольших выборок ($n \leq 5$) для представления данных использовали программу Microsoft Excel. Данные на рисунках представлены в виде $\text{среднее} \pm \text{стандартное отклонение}$.

2. Определение фторпроизводного VR в образцах плазмы крови проводили методом газовой хроматографии (ГХ) с тандемной масс-спектрометрией (МС/МС) [6, 13], с использованием газового хроматографа модель 7890 А с масс-селективным детектором с тройным квадруполом («Agilent», модель 7000); программное обеспечение Masshunter (условия ГХ-МС/МС анализа: температура испарителя 250°C ; ввод пробы без деления потока (1.0 мин); температурная программа: 40°C (1 мин) – 10°C/мин – 250°C (2 мин), post-run 280°C (5 мин); газ-носитель гелий, расход через колонку $1 \text{ см}^3/\text{мин}$; температура интерфейса 280°C ; температура источника ионов 150°C ; температура масс-фильтра 150°C ; скорость потока газов в ячейку столкновений азота $1.5 \text{ см}^3/\text{мин}$; гелия $2.25 \text{ см}^3/\text{мин}$; ток эмиссии на филаменте 200 мкА ; напряжение на умножителе (Gain Factor) 10; время задержки растворителя 3 мин. Детектирование осуществлялось в режиме мониторинга множественных реакций: $99 \rightarrow 81$ (16 эВ); $112 \rightarrow 82$ (5 эВ), $112 \rightarrow 67$ (15 эВ). Капиллярная кварцевая колонка HP-5MS – $60 \text{ м} \times 0,25 \text{ мм} \times 0,25 \text{ мкм}$ с привитой неподвижной фазой

(5% фенил 95% диметилполисилоксан) (Supelco, код по каталогу 19091S-436).

Подготовка проб плазмы крови к анализу

В пластиковую пробирку (эппендорф) вместимостью 2 мл, содержащую 0.5 мл плазмы крови, добавляли 1.2 мл 0.2 М ацетатного буфера (рН 3.5) и 0.2 мл 5.25 М раствора фтористого калия. Пробу выдерживали в течение 30 минут в термостате при $32 \pm 2^\circ\text{C}$, центрифугировали 15 мин при 14000 об/мин. Сорбент Oasis HLB (60 мг) кондиционировали 1 мл метанола и 1 мл деионизованной воды. Подготовленный образец биопробы пропускали через сорбент со скоростью 1 капля/с. Затем сорбент сушили под слабым вакуумом в течение 15 мин. Элюирование целевого вещества проводили хлористым метилом (3 0.5 мл). Элюат собирали в виалу с коническим дном вместимостью 2,0 мл через воронку с сульфатом натрия и затем концентрировали в токе азота до 100 мкл. 0,001 мл экстракта подвергали ГХ анализу.

3. Определение алкилметилфосфоновых кислот в моче проводили методом жидкостной хроматографии (ЖХ) с тандемной масс-спектрометрией (МС/МС) в режиме высокого разрешения [14] с использованием жидкостного хроматографа модель Accela 1250 и масс-селективного детектора Orbitrap LTQ Velos (электроспрей HESI – II, режим отрицательной ионизации), «Thermo Scientific». Температура распылителя – 300°C , температура капилляра – 370°C , скорость потока защитного газа – 50 psi, скорость потока вспомогательного газа – 17 у.ед., напряжение на капилляре – плюс 3000 В. Состав подвижной фазы: компонент А – водный раствор формиата аммония с концентрацией 10 ммоль-дм³; компонент Б – раствор формиата аммония с концентрацией 10 ммоль-дм³ в метаноле (0 мин – 5% компонента Б (Б); 5 мин – 5% Б; 12 мин – 70% Б; 20 мин – 80% Б; 20,01-5% Б; 32 мин – 5% Б). Детектирование осуществляется при высоком разрешении (30000), тип диссоциации – CID: ИбМФК–151.053 → 94.990 (35 ev); d3 ИбМФК 154.053 → 98.009 (35 ev).

Подготовка проб мочи к ВЭЖХ-МС/МС анализу. В образец мочи объемом 1.0 см³ вносили 0.005 см³ водного раствора d3-ИбМФК с концентрацией 0.005 мг-см³. Образец центрифугировали в течение 10 мин при 2000 g, фильтровали через фильтр Supelco Iso – Disc Filters N – 13 – 4, Nylon 13 мм × 0.45 мкм и разбавляли деионизованной водой в соотношении 1:3. Объем пробы для анализа 0.005 см³.

4. Определение свободных и этерифицированных жирных кислот в плазме крови проводили двухстадийным методом [15, 16]. Первая стадия – переэтерификация ЭЖК раствором метилата калия в метаноле, вторая – экстрактивное алки-

лирование СЖК и измерение концентраций метиловых эфиров методом ГХ с масс-селективным детектированием (газовый хроматограф Agilent 7890А с масс-селективным детектором Agilent 5975 и капиллярной колонкой HP-5MS (30м × 250мкм × 0.25мкм)).

Результаты и обсуждение.

Определение активности холинэстераз

Традиционно для установления факта воздействия ФОВ используют фотоколориметрические методы анализа, позволяющие определить степень ингибирования АХЭ, присутствующей на поверхности мембран эритроцитов, или родственного ей фермента БХЭ, который демонстрирует достаточно высокую активность в сыворотке и плазме крови. Подобные методы ежедневно используются в мониторинге здоровья персонала, контактирующего с ФОВ в производственных условиях.

На рисунках 2 – 3 представлены данные по изменению активности АХЭ мембран эритроцитов и БХЭ плазмы крови после отравления животных VR в дозе $2 \times 0,4 \text{ ПД}_{50}$ в условиях антидотной терапии и без нее.

Статистически значимые отличия в активности БХЭ плазмы крови подопытных животных по сравнению с контрольными значениями были установлены только для временного интервала 3 часа. Антидотная терапия практически не оказала влияния на значение данного биохимического показателя в более отдаленные сроки. Предел ретроспективных возможностей метода определения активности АХЭ мембран эритроцитов после применения карбоксима также составляет 3 часа. В отличие от БХЭ уровень активности АХЭ очень чувствителен к использованию антидота. В отсутствие реактиватора ретроспективная возможность метода составляет 3 дня с момента отравления VR (рис. 2). Таким образом, при исследовании эффективности реактиваторов активность АХЭ мембран эритроцитов является весьма информативным показателем, позволившим подтвердить эффективность карбоксима в антидотной терапии отравлений VR.

Определение алкилметилфосфоновых кислот

Определение низкомолекулярных продуктов гидролиза ФОВ – алкилметилфосфоновых кислот (АМФК) в моче является одним из наиболее простых способов установления факта воздействия ФОВ на организм [17]. О-изобутилметилфосфоновая кислота (ИбМФК) является маркером VR, тогда как метилфосфоновая кислота (МФК) – универсальный маркер всех ФОВ [18], рисунок 4.

Экскреция с мочой – основной путь выведения метаболитов ФОВ из организма. Гораздо меньшее их количество выводится с калом или

образует ковалентные связи с белками. По данным [19], 90% от общего количества метаболитов ФОВ выводится в первые 48 – 72 ч после отравления. Исследование биожидкостей жертв террористических атак (зарин, VX) и экспонированных ФОВ лабораторных животных [20, 21] показало, что максимальный уровень экскреции МФК достигается через 10–18 часов после воздействия [22].

Таблица 1

Результаты определения (нг/мл) ИБМФК в образцах мочи, полученных после отравления крыс VR в дозе $2 \times 0.4 \text{ ЛД}_{50}$ ($\delta \pm 25\%$ при $P = 0.95$)

Время после интоксикации, сутки	(n=2)	
	VR	VR + карбоксим
1	7.4	17.0
3	1.0	<0.5
7	<0.5	<0.5

Определение ИБМФК в образцах мочи проводили методом ВЭЖХ-МС/МС в режиме высокого разрешения (ВР). Предел обнаружения ИБМФК составляет $0.5 \text{ нг} \cdot \text{см}^3$ [14], таблица 1.

Результаты определения ИБМФК в образцах мочи, полученных после отравления крыс VR в дозе $2 \times 0.4 \text{ ЛД}_{50}$

Через сутки после отравления и введения карбоксима концентрация ИБМФК в пробах мочи животных была в 2,5 раза выше по сравнению с образцами мочи от животных, которым после отравления не вводили реактиватор. Реактивированный карбоксим из состава биоконъюгатов VR гидролизует и выводится с мочой в быстрой фазе элиминации.

Определение О-изобутилметилфторфосфоната, регенерированного из состава белковых аддуктов с помощью фторид-иона

Реактивированные из состава биоконъюгатов плазмы крови *ex vivo* ФОВ используются анализаторами в качестве маркеров воздействия. Первая успешная попытка ретроспективного анализа в целях установления факта воздействия ФОВ на организм путем реактивирования БХЭ была предпринята Полхиусом с соавторами [23]. После реактивирования зарин был обнаружен в сыворотке крови 10-ти из 11-ти жертв террористической атаки секты АУМ Синрике в Токийском метро и в 2-х из 7-ми образцов сыворотки крови жертв трагедии в Мацумото. Высокий потенциал метода реактивирования, реализованного в процедуре, описанной в работе [24], для установления факта воздействия ФОВ был продемонстрирован в работе [25] на примере анализа образцов плазмы крови сотрудника лаборатории, который случайно подвергся ингаляционному воздействию VX в концентрации порядка $0,026 \text{ мкг/м}^3$ (норматив для рабочей зоны – $0,001 \text{ мкг/м}^3$). Отравление первоначально было диагностировано по клиническим симптомам (миоз, затрудненное дыхание и др.), в связи с чем была произведена оксимная терапия (600 мг пралидоксима и 2 мг атропина). Анализ активности ХЭ крови не выявил существенного угнетения,

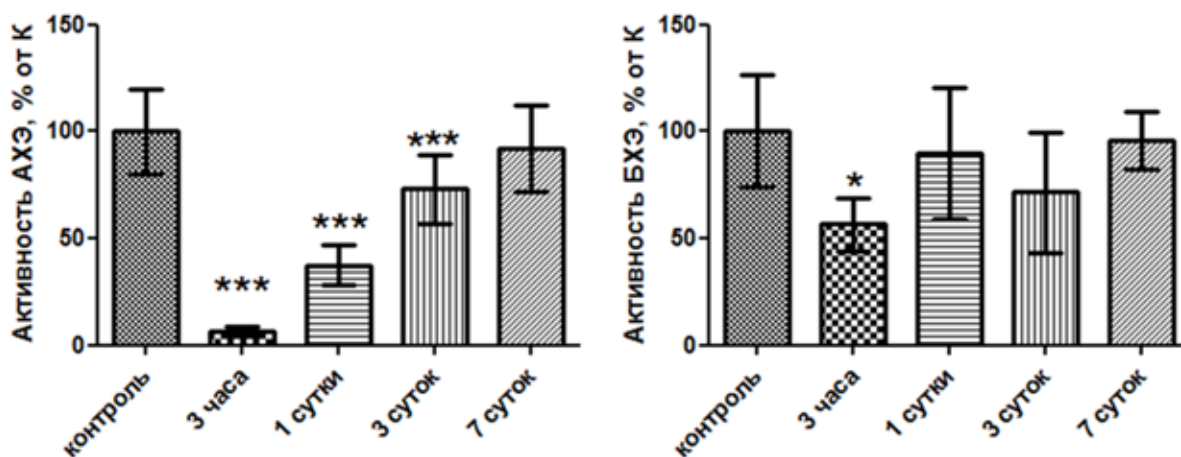


Рис. 2. Активность АХЭ мембран эритроцитов и БХЭ плазмы крови крыс на разных сроках после отравления VR ($2 \times 0.4 \text{ ЛД}_{50}$), n=6

а через 24 часа уже никаких клинических проявлений не было. В то же время, в образцах плазмы крови, обработанных в кислой среде фторидом натрия, был идентифицирован О-этилметилфторфосфонат (VX-G) в концентрациях от 81.4 пг/мл

в первый день после отравления до 6.9 пг/мл на 27-й день (предел определения метода – 5,5 пг/мл VX-G), в образцах эритроцитов – от 220 пг/мл в первый день до 97 пг/мл на 27-й день после экспозиции [26]. С учетом того, что концентрация БХЭ в плазме крови человека составляет около 80 нМ, следует, что метод позволяет подтверждать воздействие низких доз VX, поскольку маркер надежно детектируется при уровне ингибирования БХЭ > 0,05%.

Влияние антидотной терапии карбоксимом на возможность подтверждения интоксикации VR путем определения VR-G – продукта его реактивирования фторид-ионом из биоконъюгатов плазмы крови, было исследовано в эксперименте. На рисунке 5 представлены результаты определения VR-G в плазме крови после подкожного введения раствора VR в дозе 9,6 мкг/кг ($2 \times 0,4 \text{LD}_{50}$) без применения и с применением реактиватора карбоксима.

Через 24 ч после интоксикации VR содержание VR-G в плазме крови животных, получавших карбоксим, примерно в 2 раза ниже в сравнении с образцами плазмы крови животных без терапии. Через 3 дня и 7 дней после интоксикации отличий между двумя группами животных не выявлено; уровень VR-G, регенерированного из плазмы крови животных обеих групп, составил 0,3 нг/мл. В образцах плазмы крови, полученных через 30 дней после интоксикации, VR-G не был обнаружен.

Определение свободных и этерифицированных жирных кислот

Биомаркерами в токсикологии считаются показатели токсикодинамики (физиологические, биохимические, иммунологические и др.), изменение которых во времени является следствием воздействия токсиканта на организм [27]. С помощью биомаркеров можно проводить количественную оценку реакции организма на внешнее воздействие [28]. С целью выделения именно этого аспекта биомаркеров, в 2001 г. согласительная комиссия Национального института здоровья США определила смысл термина «биомаркер» как показатель (признак), который можно объективно измерить (т.е. количественно охарактер-

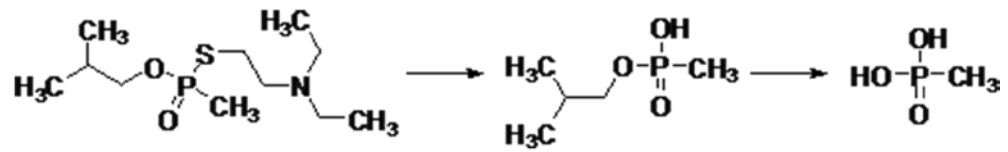


Рис. 3. Активность АХЭ мембран эритроцитов и БХЭ плазмы крови крыс на разных сроках после отравления VR ($2 \times 0,4 \text{LD}_{50}$) с применением реактиватора карбоксима, $n=6$

ризовать) и который может служить индикатором нормального или патологического течения биологических процессов, либо индикатором ответа на фармакологическое или иное вмешательство. Многие биомаркеры имеют эндогенную природу и служат для оценки динамики изменения состояния живого организма, в отличие от кинетических показателей ксенометаболитов, характеризующих судьбу того или иного ксенобиотика в организме. Токсикодинамические индикаторы отравления, в том числе отравления ФОВ, проявляются, как правило, на более поздних сроках по сравнению с токсикокинетическими индикаторами [29]. В связи с этим в токсикологии все больше внимания уделяется поиску взаимосвязей между кинетическими и динамическими показателями, т.е. между химическими и биологическими маркерами, и построению соответствующих моделей [30,31,32]. Ранее мы исследовали токсикодинамику интоксикации фтор- и фосфорорганическими соединениями, используя при этом методы электрофизиологии, лабораторной и клинической биохимии, гематологии, гемостазиологии и MALDI-масс-спектрометрии [33-39]. С развитием новых технологий химического анализа стало возможным использовать методы хроматомасс-спектрометрии для оценки метаболических расстройств по изменению уровня биогенных органических кислот (гидрокси-, кето-, amino- и поликислот) [40 – 44]. В настоящей работе мы проследили динамику тридцати жирных кислот (ЖК) с длиной цепи C11-C24 в плазме крови при острой интоксикации крыс VR. Изменения концентраций индивидуальных ЖК в образцах плазмы крови животных, отравленных ФОВ с применением и без применения антидотной терапии, самостоятельного диагностического значения не имеют. В то же время, было выявлено статистически значимое увеличение суммарных концентраций этерифицированных (на 30%) и свободных форм ЖК (на 81%) в плазме крови через неделю после введения VR в дозе $2 \times 0,4 \text{LD}_{50}$, рисунки 6 и 7.

Через 3 часа наблюдается достоверное ($P < 0,05$) повышение уровня СЖК на 36%, через 24 ч и суммарная концентрация СЖК снижается до уровня

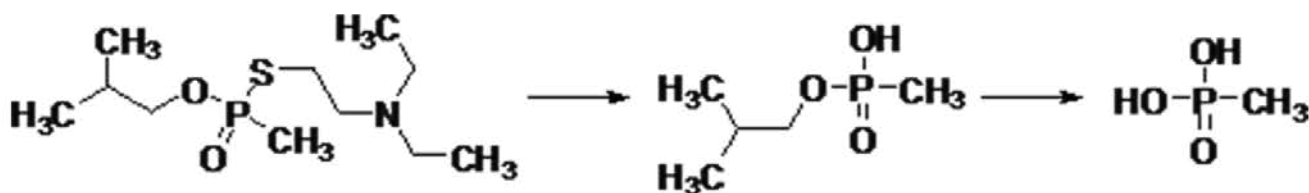


Рис. 4. Схема образования продуктов гидролиза VR

контрольной группы, а затем наблюдается постепенный рост; через 7 дней уровни СЖК превышают соответствующие уровни в контрольной группе на 81% ($P < 0,05$). Терапия карбоксимом изменяет динамику метаболизма липидов: в период 0–72 ч уровень СЖК достоверно ($P < 0,05$) повышен на 18–43% (максимум через 3 ч), однако через 7 дней снижается до нормы. Динамика ЭЖК в целом соответствует динамике СЖК.

Заключение. Сравнительная токсикокинетика и токсикодинамика различных ФОВ, а также эффективность антидотной терапии зависят от ряда факторов, среди которых можно отметить молярное количество эквитоксических доз ФОВ, их физико-химические характеристики (коэффициент распределения, размеры молекул, заряд и др.), особенности транспорта и взаимодействия с вторичными мишенями, «старение» ковалентных аддуктов [45]. Хотя V-газы обладают мак-

симальной токсичностью среди ФОВ, аддукты этих соединений практически не «стареют» и отличаются довольно высокой спонтанной реактивацией, а реактивация АХЭ оксимами гораздо эффективнее при воздействии веществ группы V, по сравнению с заринем и зоманом [46]. Возможности химических методов ретроспективного анализа при регенерации ФОВ из состава белковых аддуктов плазмы крови крыс с помощью фторид-иона существенно выше по сравнению с определением продуктов гидролиза ФОВ в моче и составили 7 дней при отравлении VR в дозе $2 \times 0,4 \text{ ЛД}_{50}$ в нашем эксперименте, но могут быть продлены при дальнейшей оптимизации процедуры.

Что касается токсикодинамических показателей, АХЭ – более чувствительный биомаркер по сравнению с БХЭ плазмы крови крыс при интоксикации VR. Однако использование реакти-

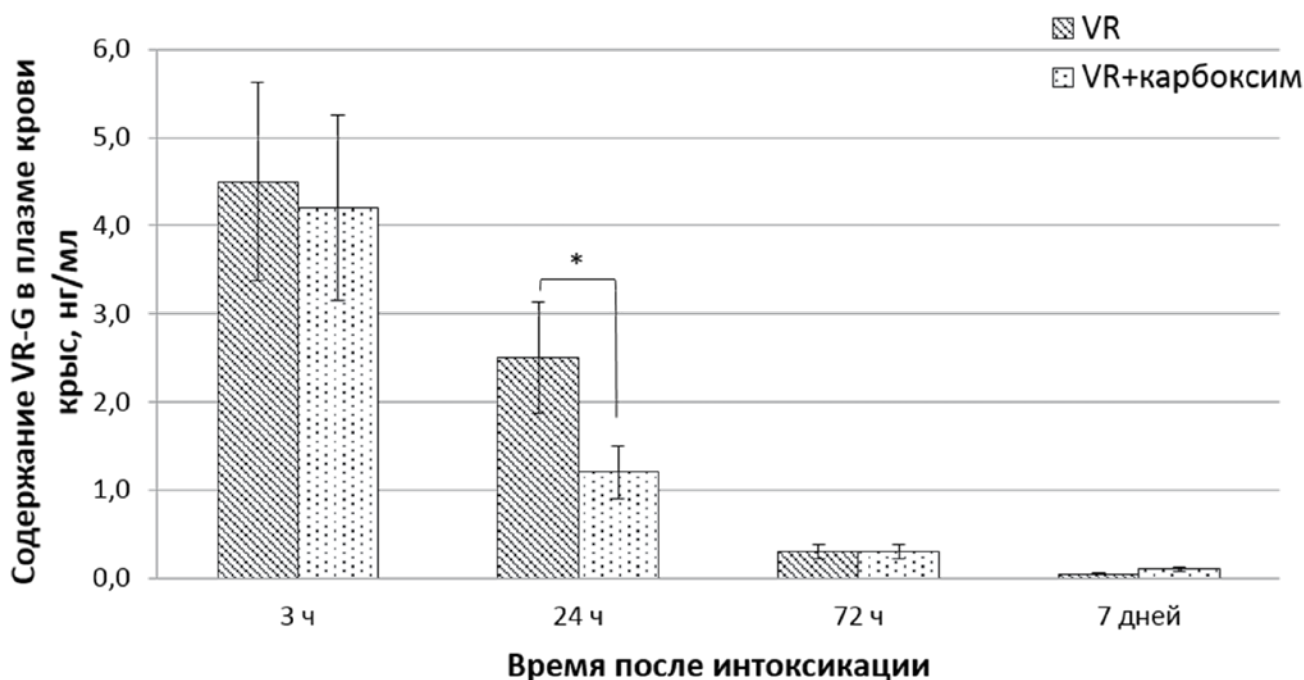


Рис. 5. Динамика VR-G в плазме крови после регенерации фторид-ионом при отравлении VR в дозе $9,6 \text{ мкг/кг}$ ($2 \times 0,4 \text{ ЛД}_{50}$) без терапии и с применением реактиватора карбоксима. Знаком «*» отмечены статистически значимые изменения ($P < 0,05$)

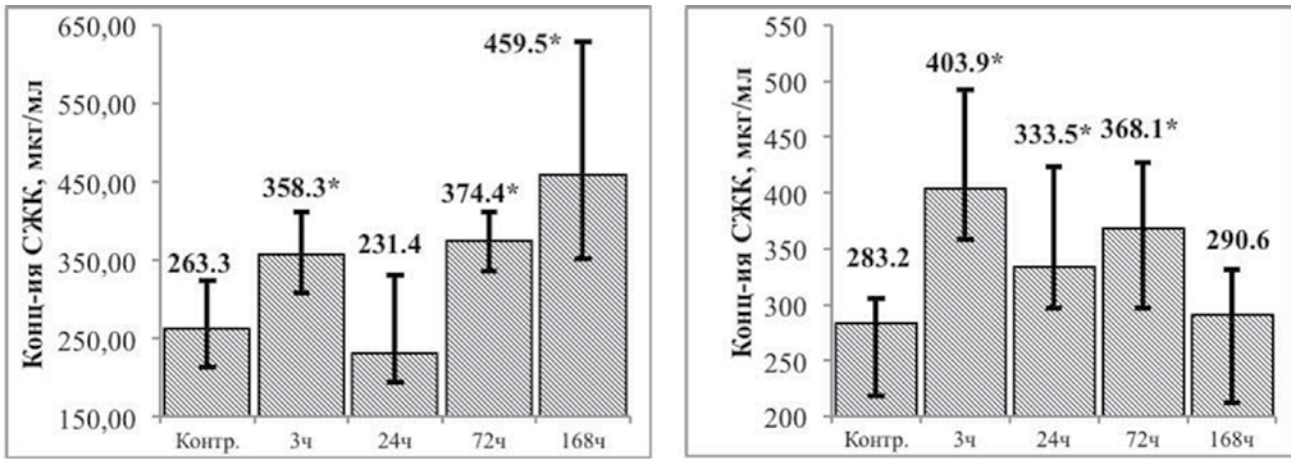


Рис. 6. Изменение суммарного содержания СЖК после отравления VR в дозе $2 \times 0.4LD_{50}$ без терапии (слева) и совместно с карбоксимом (справа); $n=6$
 Знаком «*» отмечены статистически значимые изменения ($P < 0,05$)

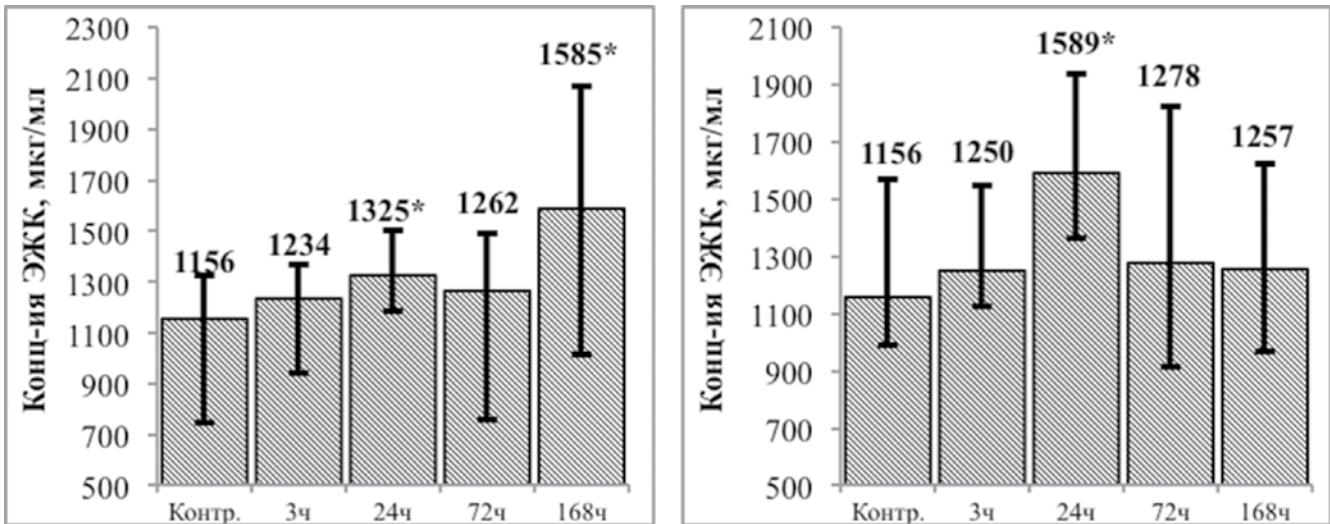


Рис. 7. Изменение суммарного содержания ЭЖК после отравления VR в дозе $2 \times 0.4LD_{50}$ без терапии (слева) и совместно с карбоксимом (справа); $n=6$
 Знаком «*» отмечены статистически значимые изменения ($P < 0,05$)

ватора (карбоксима) нивелирует различия чувствительности двух биохимических методов, уменьшая временной интервал ретроспективной диагностики до 3-х часов. При интерпретации полученных данных следует иметь в виду, что карбоксилэстеразы (КЭ) имеют широкую субстратную специфичность и являются мишенями ФОВ. Наибольшая активность КЭ обнаружена в тонком кишечнике, печени, моноцитах/макрофагах, а грызуны отличаются высокой активностью КЭ в плазме крови [47,48]. Ранее было установлено, что степень ингибирования КЭ *in vivo* эквитоксическими дозами ФОВ прямо пропорциональна отношению бимолекулярных констант скорости ингибирования k_i для КЭ и АХЭ и, следовательно, обратно пропорциональна токсичности ФОВ [49]. Вещества группы V являют-

ся исключением из этой закономерности, хорошо взаимодействуя как с АХЭ, так и с КЭ. Возможно, высокая липофильность VR предопределяет его взаимодействие с более гидрофобными мишенями (Садлоу 1 сайт альбумина) [50,51,52], что способствует эффективному транспорту токсиканта к приоритетным мишеням (АХЭ).

Измерение концентраций СЖК и ЭЖК в плазме крови может дополнить комплекс показателей при отравлении ФОВ, причем для ретроспективной диагностики в течение трех суток после отравления факт применения антидотной терапии оксимами значения не имеет. В дальнейшей оценке, в качестве патогномичного признака отравления VR, в первую очередь при нелеченой интоксикации, необходимо измерение СЖК и ЭЖК в отставленные сроки (более 3 суток).

Измерение концентраций СЖК и ЭЖК в плазме крови может позволить расширить арсенал средств исследования детоксикационных возможностей организма, адаптационных реакций и гомеостаза, позволит существенно повысить надежность диагностики, а также получить дополнительные сведения о тяжести последствий и патогенезе отравления.

Благодарности: Авторы выражают глубокую признательность канд.мед.наук Бельтюкову П.П. за участие в работе, канд.хим.наук Ко-

пейкину В.А. за проведение подтверждающего анализа методом ГХ-МС высокого разрешения, канд.биол.наук Каракашеву Г.В. за реализацию метода ВЭЖХ-МС/МС, канд.биол.наук Войтенко Н.Г. за участие в проведении токсикологического эксперимента на лабораторных животных, инженеру Конева В.Ю. за подготовку проб к анализу.

Работа выполнена в рамках государственного контракта по заказу ФМБА России.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Worek F., Thiermann H., Szinicz L., Eyer P. Kinetic analysis of interactions between human acetylcholinesterase, structurally different organophosphorus compounds and oximes. *Biochem. Pharmacol.* 2004; 68: 2237-2248.
2. Prokofieva D.S., Voitenko N.G., Gustyleva L.K., Babakov V.N., Savileva E.I., Jenkins R.O., Goncharov N.V. Microplate spectroscopic methods for determination of the organophosphate soman // *J. Environ. Monit.* 2010; 12(6): 1349-54.
3. Prokofieva DS, Jenkins RO, Goncharov NV. Microplate biochemical determination of Russian VX: Influence of admixtures and avoidance of false negative results. *Anal Biochem.* 2012; 424(2):108-13.
4. Краснов И.А., Подольская Е.П., Гончаров Н.В., Бабанов В.Н., Глашкина Л.М., Ермолаева Е.Е., Дубровский Я.А., Прокофьева Д.С., Войтенко Н.Г., Смолихина Т.И., Поляков Н.Б., Радилов А.С., Краснов Н.В. Изменения спектра производных фибриноленида в плазме крови при действии О-изобутил-S-(2-дизитиламиноэтил)метилтиофосфоната. Научное приборостроение. 2008; 18(4): 29-36.
5. Бабанов В.Н., Подольская Е.П., Гончаров Н.В., Глашкина Л.М., Краснов И.А., Поляков Н.Б., Войтенко Н.Г., Прокофьева Д.С., Краснов Н.В., А.С. Радилов. Новые маркеры интоксикации фосфорорганическими соединениями в пептидной фракции плазмы крови крыс. *Токсикологический вестник.* 2010; 2: 31-38.
6. Корягина Н.Л., Савельева Е.И., Хлебникова Н.С., Копейкин В.А., Конева В.Ю., Радилов А.С. Особенности анализа фосфорорганических отравляющих веществ, реактивированных из состава аддуктов с белками крови при установлении факта воздействия химического оружия. *Токсикологический вестник.* 2014; 4: 39-46.
7. Black R. M. Historical and perspectives of bioanalytical methods for chemical warfare // *J. of chromatography B.* 2010; 878: 1207-1215.
8. Уколов А.И., Орлова Т.И., Савельева Е.И., Радилов А.С., Гончаров Н.В. Изменения профилей жирных кислот плазмы крови крыс при введении сублетальных количеств фосфорорганических отравляющих веществ. *Токсикологический вестник.* 2015; 132(3): 2-11.
9. Worek F., Thiermann H., Szinicz L., Eyer P. Kinetic analysis of interactions between human acetylcholinesterase, structurally different organophosphorus compounds and oximes // *Biochem. Pharmacol.* 2004; 68: 2237-2248.
10. Юдин М. А., Быков В. Н., Никифоров А. С., Сарана М. А. Особенности проявления нехолинергического действия блокаторов центральных мускариновых рецепторов. *Токсикологический Вестник.* 2014; 2:10-15.
11. Worek F., Thiermann H., Szinicz L., Eyer P. Kinetic analysis of interactions between human acetylcholinesterase, structurally different organophosphorus compounds and oximes // *Biochem. Pharmacol.* 2004; 68: 2237-2248.
12. Петров А.Н., Софронов Г.А., Нечипоренко С.П., Сомин И.Н. Антидоты фосфорорганических отравляющих веществ. *Рос. хим. ж.* 2004; 48(2): 110-116.
13. Савельева Е.И., Корягина Н.Л., Копейкин В.А., Сорокоумов П.Н., Конева В.Ю. Методика измерений массовых концентраций фосфорорганических веществ, реактивированных из состава аддуктов, в плазме крови методом газовой хромато-масс-спектрометрии. Свидетельство об аттестации № 222.0255/01.00258/О.А. от 22.10.14 г.
14. Каракашев Г.В., Криворотова Н.В., Морозова Т.Е., Корягина Н.Л., Савельева Е.И., Копейкин В.А. Методика измерений массовых концентраций О-алкилметилфосфонатов в моче методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-селективным детектированием. Свидетельство об аттестации № 222.0183/01.00258//2012 от 02.08.2012. ФР.1.39.2012.13710.
15. Уколов А.И., Орлова Т.И., Савельева Е.И., Радилов А.С. Хромато-масс-спектрометрическое определение свободных жирных кислот в плазме крови и моче с использованием экстрактивного алкилирования. *Журн. анал. химии.* 2015; 70(9): 968-975.
16. Орлова Т.И., Уколов А.И., Савельева Е.И., Радилов А.С. Определение свободных и этерифицированных жирных кислот в плазме крови методом газовой хроматографии с масс-селективным детектированием. *Аналитика и контроль.* 2015; 19(2): 183-188.
17. Корягина Н.Л., Савельева Е.И., Хлебникова Н.С., Уколов А.И., Уколова Е.С., Каракашев Г.В., Радилов А.С. Хромато-масс-спектрометрическое определение алкилметилфосфонатов в моче. «Масс-спектрометрия». 2015; 12(4): 236-246.
18. Munro N. B., Talmage S.S., Griffin L.C., Waters A.P., Watson A.P., King J.F., and Hauschild V. The toxicity, fate, and toxicity of chemical warfare agent degradation products // *Environ. Health Perspect.* 1999; 107(12): 933-974.
19. Riches J., Morton L., Read R.W., Black R.M. The trace analysis of alkyl alkylphosphonic acids in urine using gas chromatography-ion trap negative ion tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.* 2005; 816(1-2): 251-258.
20. Nagao M., Takatori T., Matsuda Y. et al. Definitive Evidence for the Acute Sarin Poisoning Diagnosis in the Tokyo Subway. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1997; 144(1):198-203.
21. Noort D., Hulst A.G., Platenburg D.H.J.M., Polhuijs M., Benschop H.P. Quantitative analysis of O-isopropyl methylphosphonic acid in serum samples of Japanese citizens allegedly exposed to sarin: estimation of internal dosage. *Arch. Toxicol.* 1998; 72(10): 671-675.
22. Minami M., Hui D-M, Katsumata M., Inagaki H., Boulet C.A. Method for the analysis of methylphosphonic acid metabolites of sarin and its ethanol-substituted analogue in urine as applied to the victims of the Tokyo sarin disaster // *J.Chromatogr. B.* 1997; 695(2): 237-244.
23. Polhuijs M., Langenberg J.P., Benschop H.P. New Method for Retrospective Detection of Exposure to Organophosphorus Anticholinesterases: Application to Alleged Sarin Victims of Japanese Terrorists. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1997; 146 (1): 156-161.
24. Holland K. E., Solano M. I., Johnson R. C. et al. Modifications to the Organophosphorus Nerve Agent-Protein Adduct Refluoridation Method for Retrospective Analysis of Nerve Agent Exposures. *J. Anal. Toxicol.* 2008; 32(1): 116-124.
25. Solano M. I., Thomas J. D., Taylor J. T. et al. Quantification of Nerve Agent VX-Butyrylcholinesterase Adduct Biomarker from an Accidental Exposure. *J. Anal. Toxicol.* 2008; 32(1): 68-73.
26. McGuire J.M., Taylor J. T., Byers C.E., Jakubowski E. M., Thomson S. A. Determination of VX-G Analogue in Red Blood Cells via Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Following an Accidental Exposure to VX. *J. Anal. Toxicol.* 2008; 32(1): 73-78.
27. Войтенко Н.Г., Прокофьева Д.С., Гончаров Н.В. Проблемы диагностики при интоксикации фосфорорганическими соединениями. *Токсикологический Вестник.* 2013; 5: 2-6.
28. WHO 1993. Biomarkers and Risk Assessment: Concepts and Principles. Geneva:World Health Organization.
29. Ashauer R, Hintermeister A, Caravatti I, Kretschmann A, Escher BI. Toxicokinetic and toxicodynamic modeling explains carry-over toxicity from exposure to diazinon by slow organism recovery. *Environ Sci Technol.* 2010; 44(10): 3963-3971.
30. Ashauer R, Escher BI. Advantages of toxicokinetic and toxicodynamic modelling in aquatic ecotoxicology and risk assessment. *J Environ Monit.* 2010; 12(11): 2056-2061.
31. Escher BI, Ashauer R, Dyer S, Hermens JL, Lee JH, Leslie HA, Mayer P, Meador JP, Warne MS. Crucial role of mechanisms and modes of toxic action for understanding tissue residue toxicity and internal effect concentrations of organic chemicals. *Integr Environ Assess Manag.* 2011; 7(1): 28-49.
32. Park YC, Lee S, Cho MH. The Simplest Flowchart Stating the Mechanisms for Organic Xenobiotics-induced Toxicity: Can it Possibly be Accepted as a "Central Dogma" for Toxic Mechanisms? *Toxicol Res.* 2014; 30(3): 179-84.
33. Kuznetsov S.V., Jenkins R.O., Goncharov N.V. Electrophysiological study of infant and adult rats under acute intoxication with fluoroacetamide. *J. Appl. Toxicol.* 2007; 27(6): 561-572.
34. Ермолаева Е.Е., Н.В. Гончаров, А.С. Радилов, Л.М. Глашкина, А.В. Кузнецов, И.В. Миндужев, П.В. Авдонин, И.А. Добрылюк, В.Р. Рембовский. Ингибирование эстераз и функциональная активность макрофагов, тромбоцитов, эндотелия при низкорезовом воздействии дизопропилфторфосфата и фосфакола. *Токсикологический вестник.* 2008; 2: 3-9.
35. Ермолаева Е.Е., Н.В. Гончаров, А.С. Радилов, А.В. Кузнецов, Л.М. Глашкина, И.В. Миндужев, С.В. Кузнецов, Г.А. Протасова, И.А. Добрылюк. Активность эстераз, состояние тромбоцитарного звена гомеостаза, нейро-мышечной проводимости и морфологические изменения при моделировании хронической пероральной интоксикации веществом, типа VX. *Токсикологический вестник.* 2008; 3: 3-10.
36. Шмурак В.И., Курдюков И.Д., Надеев А.Д., Войтенко Н.Г., Глашкина Л.М., Гончаров Н.В. Биохимические маркеры интоксикации фосфорорганическими отравляющими веществами // *Токсикологический Вестник.* 2012; 4: 30-34.
37. Гарнюк В.В., Войтенко Н.Г., Волкова М.О., Максаква А.М., Гончаров Н.В. Гемопоз у лабораторных животных при остром отравлении фосфорорганическими отравляющими веществами // *Токсикологический Вестник.* 2012; 4: 35-40.
38. Винокуров М.Г., Надеев А.Д., Войтенко Н.Г., Гончаров Н.В. Исследование клеточной иммунной системы при действии фторацетата. *Российский иммунологический журнал.* 2014; 8(3): 273-275.
39. Уколов А.И., Орлова Т.И., Войтенко Н.Г., Гончаров Н.В. Исследование энергетического метаболизма

крыс при действии фторацетата. Вестник Уральской медицинской академической науки. 2014; 3(49): 64-66.

40. Matsumoto I, Kuhara T. A new chemical diagnostic method for inborn errors of metabolism by mass spectrometry. MS Reviews, 1996;15:43-57.

41. Hao H, Li S, Zhou W, Wang H, Liu M, Shi C, Chen J, Xiao X. Metabolic products in urine of preterm infants characterized via gas chromatography-mass spectrometry. Int J Clin Exp Med. 2015; 8(9):16454-16462.

42. Sun W, Wang Y, Yang Y, Wang J, Cao Y, Luo F, Lu W, Peng Y, Yao H, Qiu P. The screening of inborn errors of metabolism in sick Chinese infants by tandem mass spectrometry and gas chromatography/mass spectrometry. Clin Chim Acta. 2011; 412(13-14):1270-4.

43. Гончаров Н.В., Уколов А.И., Орлова Т.И., Мигаловская Е.Д.,

Войтенко Н.Г. Метаболизма: на пути интеграции биохимии, аналитической химии, информатики // Успехи современной биологии. 2015.- Т.135.- №1.- с.3-17.

44. Goncharov N., E. Savelieva, V. Zinchenko, S. Kuznetsov, I. Mindukshev, M. Vinokurov, P. Avdonin, N. Voitenko, A. Ukolov, T. Orlova, R. Jenkins, A. Kuznetsov. Fluoroacetate. In: R.C. Gupta (Ed.) Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents, Academic Press/Elsevier, Amsterdam, second edition, 2015: 193-214. ISBN: 978-0-12-800159-2, 1198 pp.

45. Voicu VA, Thiermann H, Rădulescu FS, Miricioiu C, Miron DS. The toxicokinetics and toxicodynamics of organophosphonates versus the pharmacokinetics and pharmacodynamics of oxime antidotes: biological consequences. Basic Clin

Pharmacol Toxicol. 2010 Feb;106(2):73-85.

46. Sidell FR, Groff WA. The reactivability of cholinesterase inhibited by VX and sarin in man. Toxicol Appl Pharmacol. 1974; 27: 241-252.

47. Xie S, Borazjani A, Hatfield MJ, Edwards CC, Potter PM, Ross MK. Inactivation of lipid glyceryl ester metabolism in human THP1 monocytes/macrophages by activated organophosphorus insecticides: role of carboxylesterases 1 and 2. Chem Res Toxicol. 2010; 23(12):1890-1904.

48. Курдюков И.Д., Шмурак В.И., Надеев А.Д., Войтенко Н.Г., Прокофьева Д.С., Гончаров Н.В. «Эстеразный статус» организма при воздействии токсических веществ и фармпрепаратов. Токсикологический Вестник. 2012; 6: 6-13.

49. Maxwell DM. The specificity of carboxylesterase protection against

the toxicity of organophosphorus compounds. Toxicol Appl Pharmacol. 1992;114(2):306-312.

50. Белинская Д.А., Шмурак В.И., Прокофьева Д.С., Гончаров Н.В. Исследование связывания зомана с альбумином методами молекулярного моделирования // Токсикологический Вестник. 2012. 6: 13-19.

51. Белинская Д.А., В.И. Шмурак, Д.С. Прокофьева, Н.В. Гончаров. Сывороточный альбумин: поиск новых сайтов взаимодействия с фосфорорганическими соединениями на примере зомана // Биоорганическая химия. 2014; 40 (5):541-549.

52. Гончаров Н.В., Д.А. Белинская, А.В. Разыграев, А.И. Уколов. О ферментативной активности альбумина. Биоорганическая химия. 2015; 41(2): 131-144.

REFERENCES:

1. Worek F., Thiermann H., Szinicz L., Eyer P. Kinetic analysis of interactions between human acetylcholinesterase, structurally different organophosphorus compounds and oximes. Biochem. Pharmacol. 2004; 68: 2237-2248.

2. Prokofieva D.S., Voitenko N.G., Gustyleva L.K., Babakov V.N., Savelieva E.I., Jenkins R.O., Goncharov N.V. Microplate spectroscopic methods for determination of the organophosphate soman. J. Environ. Monit. 2010; 12(6): 1349-1354.

3. Prokofieva D.S., Jenkins R.O., Goncharov N.V. Microplate biochemical determination of Russian VX: Influence of admixtures and avoidance of false negative results. Anal Biochem. 2012; 424(2): 108-113.

4. Krasnov I.A., Podolskaia E.P., Goncharov N.V., Babakov V.N., Glashkina L.M., Ermolaeva E.E., Dubrovskii Ya.A., Prokofieva D.S., Voitenko N.G., Smolihina T.I., Polyakov N.B., Radilov A.S., Krasnov N.V. [Changes of spectra of fibrinopeptide derivatives in plasma by the action of the O-isobutyl-S-(2-diethylaminoethyl)-methylthiophosphonate]. Nauchnoe priborostrenie. 2008; 18(4): 29-36 (in Russian).

5. Babakov V.N., Podolskaya E.P., Goncharov N.V., Glashkina L.M., Krasnov I.A., Polyakov N.B., Voitenko N.G., Prokofieva D.S., Krasnov N.V., Radilov A.S. [New markers of intoxication by organophosphorus compounds in the peptide fraction of rat plasma]. Toksikologicheskii vestnik. 2010; 2: 31-38 (in Russian).

6. Koriagina N.L., Savelieva E.I., Khlebnikova N.S., Kopeikin V.A., Koneva V.Yu., Radilov A.S. [Features of the analysis of organophosphorus agents, reactivated from the adducts with blood proteins in determining of chemical weapons]. Toksikologicheskii vestnik. 2014; 4: 39-46 (in Russian).

7. Black R. M. Historical and perspectives of bioanalytical methods for chemical warfare // J. of chromatography B. 2010; 878: 1207-1215.

8. Ukolov A.I., Orlova T.I., Savel'eva E.I., Radilov A.S., Goncharov N.V. [Administration of sublethal amounts of organophosphorus agents using antidote therapy changing fatty acid profiles of rat plasma]. Toksikologicheskii vestnik. 2015; 132(3): 2-11 (in Russian).

9. Worek F., Thiermann H., Szinicz L.,

Eyer P. Kinetic analysis of interactions between human acetylcholinesterase, structurally different organophosphorus compounds and oximes. Biochem. Pharmacol. 2004; 68: 2237-2248.

10. Yudin M.A., Bykov V.N., Nikiforov A.S., Sarana M.A. [Specific manifestations of non-cholinolytic action of central muscarinic receptors blockers]. Toksikologicheskii vestnik. 2014; 2: 10-15 (in Russian).

11. Worek F., Thiermann H., Szinicz L., Eyer P. Kinetic analysis of interactions between human acetylcholinesterase, structurally different organophosphorus compounds and oximes. Biochem. Pharmacol. 2004; 68: 2237-2248.

12. Petrov A.N., Sofronov G.A., Nechiporenko S.P., Somin I.N. Antidotes of organophosphorus warfare agents. Rossiyskiy khimicheskii zhurnal. 2004; 48 (2): 110-116 (in Russian).

13. Savel'eva E.I., Koryagina N.L., Kopeykin V.A., Sorokoumov P.N., Koneva V.Yu. Procedure for the Determination of Mass Concentrations of Organophosphorus Compounds, Reactivated from the Adducts in Blood Plasma by GC-MS. Certificate of Attestation N 222.0255/01.00258/2014 October 22, 2014 r. (in Russian).

14. Karakashev G.V., Krivorotova N.V., Morozova T.E., Koryagina N.L., Savel'eva E.I., Kopeykin V.A. Procedure for the Determination of Mass Concentrations of O-Alkyl Methyl Phosphonates in Urine by High-Performance Liquid Chromatography with Tandem Mass -Selective Detection. Certificate of Attestation N 222.0183/01.00258//2012, August 02.08.2012, FR.1.39.2012.13710 (in Russian).

15. Ukolov A.I., Orlova T.I., Savelieva E.I., Radilov A.S. Chromatographic-Mass Spectrometric Determination of Free Fatty Acids in Blood Plasma and Urine Using Extractive Alkylation. Journal of Analytical Chemistry. 2015; 70(9): 1124-1131.

16. Orlova T.I., Ukolov A.I., Savelieva E.I., Radilov A.S. GC-MS quantification of free and esterified fatty acids in blood plasma. Analitika i kontrol. 2015; 19(2): 183-188 (in Russian).

17. Koryagina N.L., Savel'eva E.I., Khlebnikova N.S., Ukolov A.I., Ukolova E.S., Karakashev G.V., Radilov A.S.

[Chromatography/mass spectrometry determination of alkyl methylphosphonic acids in urine]. Mass-spektrometriya. 2015; 12(4): 236-246 (in Russian).

18. Munro N. B., Talmage S.S., Griffin L.C., Waters A.P., Watson A.P., King J.F., and Hauschild V. The sources, fate, and toxicity of chemical warfare agent degradation products. Environ. Health Perspect. 1999; 107(12): 933-974.

19. Riches J., Morton I., Read R.W., Black R.M. The trace analysis of alkyl alkylphosphonic acids in urine using gas chromatography-ion trap negative ion tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. B. 2005; 816(1-2): 251-258.

20. Nagao M., Takatori T., Matsuda Y. et al. Definitive Evidence for the Acute Sarin Poisoning Diagnosis in the Tokyo Subway. Toxicol. Appl. Pharmacol. 1997; 144(1):198-203.

21. Noort D., Hulst A.G., Platenburg D.H.J.M., Polhuijs M., Benschop H.P. Quantitative analysis of O-isopropyl methylphosphonic acid in serum samples of Japanese citizens allegedly exposed to sarin: estimation of internal dosage. Arch. Toxicol. 1998; 72(10): 671-675.

22. Minami M., Hui D-M, Katsumata M., Inagaki H., Boulet C.A. Method for the analysis of methylphosphonic acid metabolites of sarin and its ethanol-substituted analogue in urine as applied to the victims of the Tokyo sarin disaster. J.Chromatogr. B. 1997; 695(2): 237-244.

23. Polhuijs M., Langenberg J.P., Benschop H.P. New Method for Retrospective Detection of Exposure to Organophosphorus Anticholinesterases: Application to Alleged Sarin Victims of Japanese Terrorists. Toxicol Appl Pharmacol. 1997; 146 (1): 156-161.

24. Holland K. E., Solano M. I., Johnson R. C. et al. Modifications to the Organophosphorus Nerve Agent-Protein Adduct Refluoridation Method for Retrospective Analysis of Nerve Agent Exposures. J. Anal. Toxicol. 2008; 32(1): 116-124.

25. Solano M. I., Thomas J. D., Taylor J. T. et al., Quantification of Nerve Agent VX-Butyrylcholinesterase Adduct Biomarker from an Accidental Exposure. J. Anal. Toxicol. 2008; 32(1): 68-73.

26. McGuire J.M., Taylor J. T., Byers C.E., Jakubowski E. M., Thomson S. A. Determination of VX-G Analogue in Red Blood Cells via Gas Chromatography-

Tandem Mass Spectrometry Following an Accidental Exposure to VX. J. Anal. Toxicol. 2008; 32(1): 73-78.

27. Voitenko N.G., Prokofieva D.S., Goncharov N.V. [Problems with diagnosis of intoxication by organophosphorus compounds]. Toksikologicheskii vestnik. 2013; 5: 2-6 (in Russian).

28. WHO 1993. Biomarkers and Risk Assessment: Concepts and Principles. Geneva:World Health Organization.

29. Ashauer R, Hintermeister A, Caravatti I, Kretschmann A, Escher BI. Toxicokinetic and toxicodynamic modeling explains carry-over toxicity from exposure to diazinon by slow organism recovery. Environ Sci Technol. 2010; 44(10): 3963-3971.

30. Ashauer R, Escher BI. Advantages of toxicokinetic and toxicodynamic modelling in aquatic ecotoxicology and risk assessment. J Environ Monit. 2010; 12(11): 2056-2061.

31. Escher BI, Ashauer R, Dyer S, Hermens JL, Lee JH, Leslie HA, Mayer P, Meador JP, Warne MS. Crucial role of mechanisms and modes of toxic action for understanding tissue residue toxicity and internal effect concentrations of organic chemicals. Integ Environ Assess Manag. 2011; 7(1): 28-49.

32. Park YC, Lee S, Cho MH. The Simplest Flowchart Stating the Mechanisms for Organic Xenobiotics-induced Toxicity: Can it Possibly be Accepted as a "Central Dogma" for Toxic Mechanisms? Toxicol Res. 2014; 30(3): 179-84.

33. Kuznetsov S.V., Jenkins R.O., Goncharov N.V. Electrophysiological study of infant and adult rats under acute intoxication with fluoroacetamide. J. Appl. Toxicol. 2007; 27(6): 561-572.

34. Ermolaeva E.E., Goncharov N.V., Radilov A.S., Glashkina L.M., Kuznetsov A.V., Mindukshev I.V., Avdonin P.V., Dobrylko I.A., Rembovskii V.R. [Inhibition of esterases and functional activity of macrophages, platelets, endothelium at low-level exposure to diisopropyl fluorocephosphate and phosphaco]. Toksikologicheskii vestnik. 2008; 2: 3-9 (in Russian).

35. Ermolaeva E.E., Goncharov N.V., Radilov A.S., A.B. Kuznetsov A.V., Glashkina L.M., Mindukshev I.V., Kuznetsov S.V., Protasova G.A., Dobrylko I.A. [Активность эстераз, состояние тромбоцитарного звена гемостаза, нейро-мышечной проводимости и мор-

- фологические изменения при моделировании хронической пероральной интоксикации веществом, типа VX]. *Toksikologicheskii vestnik*. 2008; 3: 3-10 (in Russian).
- 36.** *Shmurak V.I., Kurdiukov I.A., Nadeev A.D., Voitenko N.G., Glashkina L.M., Goncharov N.V.* [Biochemical markers of intoxication by organophosphorus chemical agents]. *Toksikologicheskii vestnik*. 2012; 4: 30-34 (in Russian).
- 37.** *Garmyuk V.V., Voitenko N.G., Volkova M.O., Maksakova A.O., Goncharov N.V.* [Hematopoiesis in laboratory animals with acute poisoning with organophosphorus agents]. *Toksikologicheskii vestnik*. 2012; 4: 35-40 (in Russian).
- 38.** *Vinokurov M.G., Nadeev A.D., Voitenko N.G., Goncharov N.V.* [Investigation of immune system cells exposed by fluoroacetate]. *Rossiiskii immunologicheskii zhurnal*. 2014; 8 (3): 273-275 (in Russian).
- 39.** *Ukolov A.I., Orlova T.I., Voitenko N.G., Goncharov N.V.* [The study of energy metabolism in rats under the influence of fluoroacetate]. *Vestnik Uralskoi meditsinskoi akademicheskoi nauki*. 2014; 3(49): 64-66 (in Russian).
- 40.** *Matsumoto I., Kuhara T.* A new chemical diagnostic method for inborn errors of metabolism by mass spectrometry. *MS Reviews*, 1996; 15:43-57.
- 41.** *Hao H., Li S., Zhou W., Wang H., Liu M., Shi C., Chen J., Xiao X.* Metabolic products in urine of preterm infants characterized via gas chromatography-mass spectrometry. *Int J Clin Exp Med*. 2015; 8(9):16454-16462.
- 42.** *Sun W, Wang Y, Yang Y, Wang J, Cao Y, Luo F, Lu W, Peng Y, Yao H, Qiu P.* The screening of inborn errors of metabolism in sick Chinese infants by tandem mass spectrometry and gas chromatography/mass spectrometry. *Clin Chim Acta*. 2011; 412(13-14):1270-4.
- 43.** *Goncharov N.V., Ukolov A.I., Orlova T.I., Migalovskaia E.D., Voitenko N.G.* Metabolomics: On the Way to an Integration of Biochemistry, Analytical Chemistry, and Informatics. *Biology Bulletin Reviews*, 2015; 5 (4): 296-307. DOI: 10.1134/S2079086415040027.
- 44.** *Goncharov N., E. Savelieva, V. Zinchenko, S. Kuznetsov, I. Mindukshev, M. Vinokurov, P. Avdonin, N. Voitenko, A. Ukolov, T. Orlova, R. Jenkins, A. Kuznetsov.* Fluoroacetate. In: R.C. Gupta (Ed.) *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents*, Academic Press/Elsevier, Amsterdam, second edition, 2015: 193-214. ISBN: 978-0-12-800159-2, 1198 pp.
- 45.** *Voicu VA, Thiermann H, Rădulescu FS, Mircioiu C, Miron DS.* The toxicokinetics and toxicodynamics of organophosphonates versus the pharmacokinetics and pharmacodynamics of oxime antidotes: biological consequences. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2010 Feb;106(2):73-85.
- 46.** *Sidell FR, Groff WA.* The reactivability of cholinesterase inhibited by VX and sarin in man. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1974; 27: 241-252.
- 47.** *Xie S, Borazjani A, Hatfield MJ, Edwards CC, Potter PM, Ross MK.* Inactivation of lipid glyceryl ester metabolism in human THP1 monocytes/macrophages by activated organophosphorus insecticides: role of carboxylesterases 1 and 2. *Chem Res Toxicol*. 2010; 23(12):1890-1904.
- 48.** *Kurdiukov I.D., Shmurak V.I., Nadeev A.D., Voitenko N.G., Prokofieva D.S., Goncharov N.V.* ["Esterase status" of the body when exposed to toxic substances and pharmaceuticals]. *Toksikologicheskii vestnik*. 2012; 6: 6-13 (in Russian).
- 49.** *Maxwell DM.* The specificity of carboxylesterase protection against the toxicity of organophosphorus compounds. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1992;114(2):306-312.
- 50.** *Belinskaia D.A., Shmurak V.I., Prokofieva D.S., Goncharov N.V.* [Research of soman binding to albumin with molecular modeling]. *Toksikologicheskii vestnik*. 2012. 6: 13-19 (in Russian).
- 51.** *Belinskaia D.A., Shmurak V.I., Prokofieva D.S., Goncharov N.V.* Serum Albumin: Search for New Sites of Interaction with Organophosphorus Compounds by the Example of Soman. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 2014; 40 (5): 499-519. DOI: 10.1134/S1068162014050033 (in Russian).
- 52.** *Goncharov N.V., Belinskaia D.A., Razygraev A.V., Ukolov A.I.* On the enzymatic activity of albumin. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 2015; 41(2): 113-124. DOI: 10.1134/S1068162015020041. (in Russian).

N.L. Koryagina, E.I. Savelieva, A.I. Ukolov, D.S. Prokofieva, N.S. Khlebnikova, T.I. Orlova, E.S. Ukolova, A.S. Radilov, N.V. Goncharov

POSSIBILITIES OF CHEMICAL TOXICOLOGICAL ANALYSIS IN MODELING ACUTE POISONING WITH VR AND ANTIDOTAL THERAPY USING CARBOXIM

Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology, Federal Medical Biological Agency, 188663, settlement Kuz'molovskiy, Vsevolozhsk District, Leningrad Region, Russian Federation

The effect of the cholinesterase reactivator carboxim was studied on the possibility of the determination of markers of VR (O-isobutyl S-(2-diethylaminoethyl) methylthiophosphonate) in biomedical samples obtained in in vivo acute experiments in rats injected with $2 \times 0.4LD_{50}$ of VR at 1 hour interval. It was found that acetylcholinesterase (AChE) is a more sensitive blood plasma biomarker compared to butyrylcholinesterase (BChE) in blood plasma. Carboxim therapy led to AChE reactivation 3 h after poisoning, whereas in the absence of therapy, the AChE activity recovered within 3 days. Fluoride-based regeneration of organophosphorus nerve agents (OPNAs) from blood plasma protein adducts was possible within 7 days after poisoning irrespective of whether the therapy was applied or not. The effect of the reactivator on the excretion of VR hydrolysis products was considerable. A day after poisoning and carboxim injection, O-isobutyl methylphosphonate (iBuMPA) was detected in urine at a level of 17 ng/ml against 7.4 ng/ml in the urine samples of untreated animals; after 3 days, iBuMPA could be detected at a level of 1 ng/ml exclusively in the latter urine samples. It was also found that the levels of free and esterified fatty acids in the blood plasma samples of animals not subjected to antidotal therapy reached a maximum on the 7th day after acute exposure to VR. Therefore, the blood plasma levels of free and esterified fatty acids can be used as an additional toxicodynamic parameter of VR poisoning.

Keywords: *Chemical toxicological analysis, organophosphorus nerve agents, VR, markers, gas chromatography: mass spectrometry, antidotal therapy.*

Материал поступил в редакцию 06.04.2016 г.

УДК 547.26 : 615.9 : 615.285

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ТОКСИЧНОСТЬ НЕКОТОРЫХ СПИРТОВ И КОЖНЫХ АНТИСЕПТИКОВ НА ИХ ОСНОВЕ

М.В. Бидевкина¹, О.В. Бакланова²,
Т.З. Рысина¹, И.А. Суетина²,
О.А. Лопатина², Т.Н. Потапова¹,
М.В. Мезенцева², А.В. Лиманцев¹,
Л.И. Руссу², Ж.П. Алексеева¹

¹ФБУН НИИ Дезинфектологии Роспотребнадзора,
117246, г. Москва, Российская Федерация

²ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава
России Институт вирусологии
им. Д.И. Ивановского», 123098, г. Москва,
Российская Федерация

Изучено цитотоксическое действие кожных антисептиков на основе этилового, пропилового и изопропилового спиртов на культуре клеток фибробластов эмбриона человека с помощью МТТ-теста и Системы для клеточного анализа в режиме реального времени xCELLigence, на сперматозоидах быка путем регистрации индекса токсичности. Установлена зависимость степени цитотоксичности от химического состава средства. Исследование кожно-резорбтивного действия антисептиков на крысах-отъемышах показало, что неполовозрелые самки чувствительнее к действию спиртов по сравнению с самцами. Рекомендовано применение кожных антисептиков на основе этилового и изопропилового спиртов для гигиенической обработки рук детей.

Ключевые слова: кожные антисептики, спирты, цитотоксическое действие, культура клеток, лабораторные животные.

Введение. В настоящее время в медицинской практике широко применяются спиртосодержащие кожные антисептики, предназначенные, главным образом, для взрослого населения. Этиловый (ЭС), изопропиловый (ИС) и пропиловый (ПС) спирты, используемые в кожных антисептиках в качестве действующих веществ (ДВ), относятся к умеренно или малоопасным соединениям при введении в желудок. Острая токсичность для белых мышей и крыс по данным разных

авторов для ЭС находится в диапазоне 3450-9000 мг/кг, для ИС – 3600 – 5740 мг/кг, для ПС – от 1870 до 6800 мг/кг [1,2]. При нанесении на кожу кроликов DL_{50} для ЭС превышает 20000 мг/кг, для ИС составляет 12800 мг/кг, для ПС – 5040 мг/кг [1,2]. Также известно, что при повторном воздействии на кожу спирты (особенно пропиловый и изопропиловый) могут проявлять раздражающий и резорбтивный эффекты. Это важно иметь в виду при оценке токсичности кожных анти-

Бидевкина Марина Васильевна (Bidevkina Marina Vasil'evna), кандидат медицинских наук, заведующая лабораторией токсикологии дезинфекционных средств ФБУН НИИ Дезинфектологии Роспотребнадзора, 117246, г. Москва, Российская Федерация, BidevkinaMV@niid.ru

Бакланова Ольга Владимировна (Baklanova Olga Vladimirovna), кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории культур тканей ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского», 123098, г. Москва, Российская Федерация, ov_baklanova@mail.ru

Рысина Татьяна Зосимовна (Rysina Tat'yana Zosimovna), кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории токсикологии дезинфекционных средств ФБУН НИИ Дезинфектологии Роспотребнадзора, 117246, г. Москва, Российская Федерация, Rysinatz@niid.ru

Суетина Ирина Александровна (Suetina Irina Aleksandrovna), кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории культур тканей ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского», 123098, г. Москва, Российская Федерация, cells@rambler.ru

Лопатина Ольга Алексеевна (Lopatina Olga Alekseevna), кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории культур тканей ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского», 123098, г. Москва, Российская Федерация, cells@rambler.ru

Потапова Татьяна Николаевна (Potapov Tat'yana Nikolaevna), старший научный сотрудник лаборатории токсикологии дезинфекционных средств ФБУН НИИ Дезинфектологии Роспотребнадзора, 117246, г. Москва, Российская Федерация, potapovatn@niid.ru

Мезенцева Марина Владимировна (Mezentseva Marina Vladimirovna), доктор биологических наук, заведующая лабораторией культур тканей ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского», 123098, г. Москва, Российская Федерация, matmez@mail.ru

Лиманцев Анатолий Владимирович (Limantsev Anatoliy Vladimirovich), кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории токсикологии дезинфекционных средств ФБУН НИИ Дезинфектологии Роспотребнадзора, 117246, г. Москва, Российская Федерация, av.lim@yandex.ru @niid.ru

Руссу Леонид Иванович (RussuLeonidIvanovich), научный сотрудник лаборатории культур тканей ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского», 123098, г. Москва, Российская Федерация, cells@rambler.ru

Алексеева Жанна Петровна (Alekseeva Zhanna Petrovna), научный сотрудник лаборатории токсикологии дезинфекционных средств ФБУН НИИ Дезинфектологии Роспотребнадзора, 117246, г. Москва, Российская Федерация.

септиков, учитывая их способ применения -втираниев кожу. Проникновение спиртов через кожу было изучено при многократном использовании кожных антисептиков для гигиенической обработки рук медицинского персонала (20 раз с перерывом 1 мин.) и обработки рук хирургов (10 раз с перерывом 5 мин). Средства одна обработка расходовали в количестве 4 и 20 мл соответственно. После обработки рук хирурга содержание в крови ЭС, ИП и ПС составило 0,07 мг/л, 2,56 мг/л и 4,08 мг/л соответственно. Но в целом, абсорбция этилового и пропиловых спиртов была менее 0,03%, что свидетельствует об отсутствии риска развития токсических эффектов. Однако авторы отмечают, что с помощью данного исследования нельзя оценить последствия долгосрочного, ежедневного и частого использования антисептиков для обработок рук [3, 4].

В связи с тем, что у детей кожные антисептики приходится применять довольно часто (гигиеническая обработка рук, обработка инъекционного, операционного полей и др.), особое значение приобретает выбор средств, содержащих наименее токсичные действующие вещества (ДВ).

Задачей данной работы являлась сравнительная оценка цитотоксического действия трехспиртов и кожных антисептиков, содержащих эти спирты и другие ДВ, в опытах *in vitro*: на культуре клеток фибробластов эмбриона человека (ФЭЧ) и сперматозоидах быка, а также *in vivo* на неполовозрелых крысах-отъемышах с целью выбора ДВ кожных антисептиков, предназначенных для детей.

Материалы и методы исследований. Изучена токсичность ЭС, ИС и ПСв концентрации 70% и 5 кожных антисептиков, из которых образец №1 содержал в качестве ДВ только спирты: ИС 51%, ПС 16% и бензиловый спирт 3%. Три образца содержали один спирт и одно четвертичноаммониевое соединение (ЧАС). Так, в состав кожных антисептиков №2 и №3 входили 70% ИС и 0,07% алкилдиметилбензиламмония хлорида (АБАХ) или 0,1% дидецилдиметиламмонийхлорида (ДДАХ) соответственно. Образец №4 включал 79% ЭС и АБАХ в количестве 0,11%. Образец №5 содержал наибольшее количество ДВ: 50% ИС и 25% ПС, 0,15% АБАХ, 0,05% ДДАХ и 0,2% полигексаметиленгуанидинагидрохлорида (ПГМГ). В образцах №№1-5 количество воды составляло около 30%. Кроме того, был изучен водный кожный антисептик №6 (без спирта в составе) – жидкое антибактериальное мыло, содержащее в качестве ДВ 0,25% 5-хлоро-2-(2,4-дихлорофеноксифенола (триклозан).

Исследования *in vitro* проводили на культуре подвижных клеток (сперматозоидах быка) путем регистрации индекса токсичности (ИТ) и на культуре клеток ФЭЧ (из коллекции ФГБУ

«НИИ вирусологии им. Д.И.Ивановского» МЗ РФ) с помощью МТТ-теста и Системы для клеточного анализа в режиме реального времени xCELLigence [5-8].

Для МТТ теста использовали общепринятую методику. Оптическую плотность клеточной взвеси после растворения в ДМСО восстановленного клетками формзана измеряли на спектрофотометре «ImmunoChem – 2100 MicroplateReader» при длине волны 545 нм и определяли коэффициент пролиферации (КП), сравнивая опытные образцы с контрольными.

Динамическую оценку изменения жизнеспособности клеток ФЭЧ при их контакте с кожными антисептиками регистрировали в реальном времени в Системе xCELLigence (RocheApplied Science). Использовали 16-луночные планшеты E-plate (Roche). Оценивался клеточный индекс – количественный параметр, отражающий статус клеток по их электрическому потенциалу, возникающему при контакте плазматической мембраны клетки с поверхностью золотого электрода (биосенсора), находящегося в дне каждой лунки. Регистрацию клеточного индекса проводили в течение 76 ч с интервалом 15 мин (первые 10 мин наблюдения после внесения образцов – каждые 2 мин). Анализ полученных данных проводили с помощью программного обеспечения RTCA Software 1.2.1 (Roche).

Рост клеток ФЭЧ в лунках планшета (между биосенсорами) после контакта их с определенным образцом антисептика контролировали в световом микроскопе, отмечая морфологию клеток, в конечной точке наблюдения фотографировали.

Опыты *in vivo* проведены на 40 неполовозрелых белых крысах в возрасте 20 дней, содержащихся в виварии НИИ Дезинфектологии на стандартном пищевом рационе. Экспериментальные группы животных состояли из 10 особей (по 5 самок и самцов). Животным наносили кожные антисептики (образцы №№ 1, 2 и 4) на кожу в дозе 5 г/кг

5 раз в неделю в течение 4 недель. Выбор дозы осуществляли в соответствии с МУ [9] с учетом 10-кратной гигиенической обработки кожи рук в день, увеличения нормы расхода средства 3 мл на одну обработку в 10 раз и средней массы тела человека 60 кг. У крыс измеряли массу тела, оценивали функциональное состояние нервной системы по изменению суммационно-порогового показателя (СПП) и поведенческим реакциям. В сыворотке крови определяли активность аланинамино-, аспаратамино- и трансаминаз (АЛТ, АСТ), щелочной фосфатазы (ЩФ), холинэстеразы (ХЭ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), содержание глюкозы, общего белка и альбуминов,

регистровали периферический состав крови. Для оценки функции почек измеряли суточное количество мочи, содержание мочевины в крови и моче, содержание ионов хлора в моче, рассчитывали стандартный коэффициент очищения мочевины (СКОМ). Биохимический анализ крови и мочи выполняли на автоматическом биохимическом фотометре ChamWell (Австрия). Проводили макроскопическое патоморфологическое исследование внутренних органов, определяли их массовые коэффициенты. Экспериментальные исследования проведены в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях и Приказом Минздравсоцразвития России от 23.08.2010 г № 708н « Об утверждении правил лабораторной практики».

Результаты и обсуждение. В опытах *in vitro* для сравнительной оценки, как спиртов, так и кожных антисептиков, устанавливали минимальное разведение (концентрацию) вещества, не оказывающее цитотоксического действия, так называемое минимальное нетоксичное разведение (МНР). В таблице 1 приведены результаты сравнительной токсичности спиртов на сперматозоидах быка и клетках ФЭЧ, из которых следует, что этиловый и изопропиловый спирты по определению ИТ и КП менее токсичны по сравнению с пропиловым спиртом. Результаты изучения цитотоксичности кожных антисептиков на клетках ФЭЧ с использованием МТТ теста приведены в таблице 2.

Из таблицы 2 видно, что наименее токсичным оказался образец № 1, содержащий в качестве ДВ только спирты (суммарных долей 70%): его МНР было 1:40. Добавление к ИС (в массовой доле 70%), а также к ЭС (в массовой доле 79%)

0,07-0,1% ЧАС вело к увеличению цитотоксичности: МНР образцов №№ 2 и 3 составили 1:320, а № 4 – 1:640. Более токсичным оказался образец №5, в котором сумма массовых долей ИС и ПС равнялась 75%, а сумма ЧАС была максимально высокой – 0,45%: его МНР 1:1280. Таким образом, на цитотоксичность спиртосодержащих кожных антисептиков в опытах *in vitro* значительное влияние оказывало количество ЧАС, входящих в их состав.

Образец № 6 (с триклозаном) проявил самую высокую токсичность, его МНР составило 1:105, что превышало МНР остальных антисептиков на 2-4 порядка. Регистрация клеточного ответа на кожные антисептики в реальном времени в системе xCELLigence представлена на графике (рис. 1).

Анализ динамических кривых, отражающих зависимость величины клеточного индекса от времени, показал, что уже через 1 час после внесения в лунки с клетками ФЭЧ кожных антисептиков наблюдалась их дифференциация по величине клеточного индекса, а, следовательно, по цитотоксичности. Через 10 ч наблюдения образцу №1 соответствовала величина клеточного индекса на уровне контроля (2,75), т.е. этот антисептик не проявлял токсичности. Образцы №№ 2,3,4 характеризовались более низким клеточным индексом: 2,6; 2,5; 2,4 соответственно. Резкое снижение этого показателя до 0,85 и 0,2, свидетельствующее о высокой цитотоксичности, отмечалось под влиянием образцов №№ 5 и 6. В процессе эксперимента клеточный индекс снижался как у контрольных (интактных) клеток, так и у клеток, контактировавших с антисептиками, однако, закономерность увеличения цитотоксичности от образца №1 к образцу № 6 сохранялась до конца наблюдения. Цитотоксичность кожных антисептиков, установленная в системе

Таблица 1

Сравнительная токсичность спиртов в опытах *in vitro*

Показатели	70% ЭС	70% ИС	70% ПС
МНР по ИТ (на сперматозоидах)	1:50	1:50	1:100
МНР по КП (на клетках ФЭЧ)	1:16	1:16-1:32	1:64

Таблица 2

Сравнительная токсичность кожных антисептиков (МТТ тест, клетки ФЭЧ)

№ образца	1	2	3	4	5	6
Состав ДВ, %	ИС-51 ПС-16	ИС-70 ЧАС-0,07	ИС-70 ЧАС-0,1	ЭС-79 ЧАС-0,11	ИС-50 ПС-25 ЧАС-0,45	Триклозан- 0,25
МНР	1: 40	1: 320	1: 320	1:640	1: 1280	1: 105

xCELLigence во всех временных точках в течение 76 часов совместного культивирования клеток ФЭЧ с антисептиками, совпадала с результатами, полученными в МТТ тесте.

Морфологическая характеристика клеток ФЭЧ, выросших между биосенсорами в лунках планшета, различалась в зависимости от контактировавшего с ними антисептика и соответствовала его цитотоксичности, установленной в МТТ тесте и с помощью клеточного анализатора. Самые выраженные изменения наблюдались при совместном культивировании клеток с образцом № 6. На рисунке 2 показаны неизменные клетки ФЭЧ (контрольная лунка), вытянутые, веретенообразные фибробласты. На рисунке 3 видна тотальная деструкция клеток под влиянием кожного антисептика № 6.

Таким образом, в опытах *in vitro* различными методами анализа – биохимической и электрической детекцией жизнеспособности клеток (МТТ тестом и динамической оценкой клеточного индекса по электрическому потенциалу клеток), а также определением морфологических изменений в клетках при помощи световой микроскопии – подтверждалась следующая последовательность возрастания цитотоксичности изученных кожных антисептиков: № № 1, 2, 3, 4, 5, 6. При этом цитотоксичность спиртосодержащих антисептиков возрастала с увеличением содержания в них ЧАС.

Результаты опытов *in vivo* по изучению кожно-резорбтивного действия антисептиков на неполовозрелых крысах приведены в таблице 3.

Из представленных данных следует, что нанесение на кожу образца № 1 (ИС-51, ПС-16%) вызывало снижение активности ХЭ у самцов (на 32%) и самок (на 53%) по сравнению с контролем. У самок также выявлено снижение прироста массы тела, функциональной активности почек, у самцов – снижение лейкоцитов в периферической крови (опыт: $5,76 \pm 0,9$, контр.: $10,2 \pm 1,0$ $10^9/л$, $p < 0,05$).

Под действием образца №2 (ИС-70, ЧАС-0,07%) у крысят обоего пола зарегистрировано изменение массового коэффициента тимуса, у самок отмечено снижение прироста массы тела, функциональной активности почек, изменение активности ХЭ (сниже-

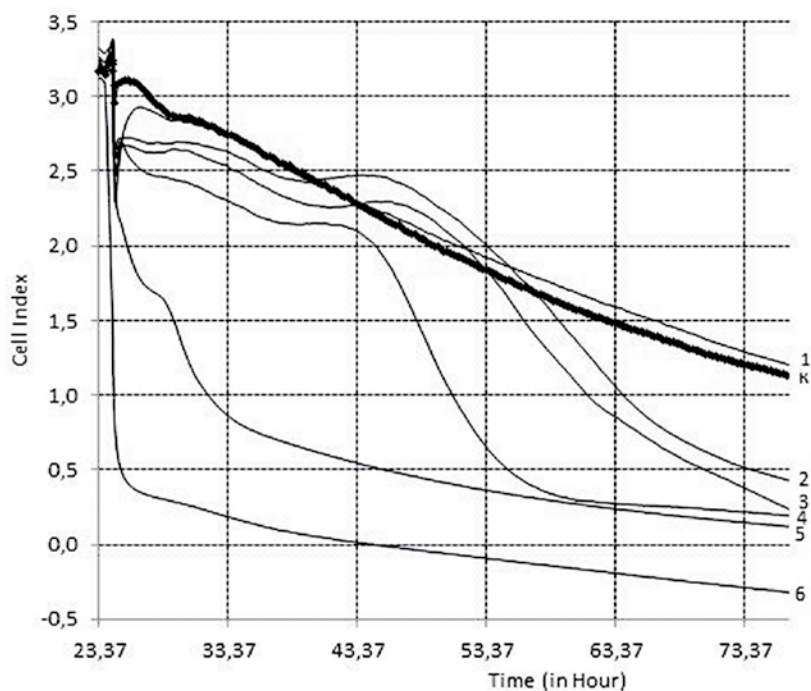


Рис. 1. Анализ цитотоксического действия кожных антисептиков в отношении клеток ФЭЧ в системе xCELLigence.

ние на 25%) и АЛТ. После аппликаций на кожу образца №4 (ЭС-79%, ЧАС-0,11 %) у самцов наблюдалось снижение коэффициентов масс почек и селезенки, у самок – снижение прироста массы тела, функциональной активности почек и ХЭ (на 15%).

Таким образом, проведенные исследования показали, что неполовозрелые самки более чувствительны к действию кожных антисептиков, чем самцы. У самок под действием всех изучен-

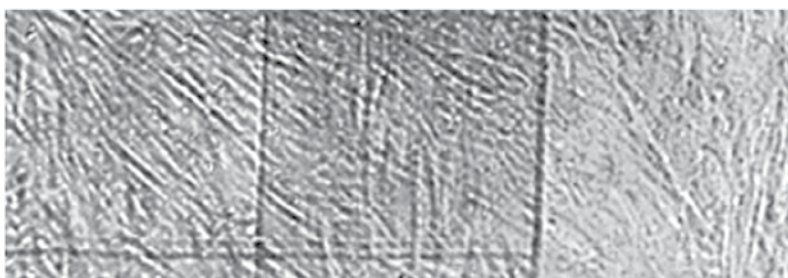


Рис. 2. Клетки ФЭЧ - контроль (Об. 6,3; ок.10)

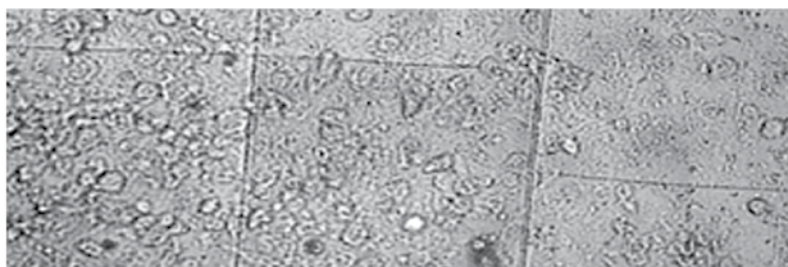


Рис. 3. Клетки ФЭЧ при культивировании с кожным антисептиком №6 (Об. 6,3; ок.10)

Таблица 3

Показатели функционального состояния крысят-отъемышей после кожного воздействия антисептиков

Показатели	Образец №1	Образец №2	Образец №4	Контроль
Самцы				
Масса тела, г: исходная	79,2 ± 4,5	83,6 ± 9,2	85, ±4,2	76,0±5,8
Через 4 недели	226,0 ± 8,82	225,6 ± 15,9	229,5±7,9	214,0±12,1
АсТ, Е/л	343,7 ± 28,5	365,5 ± 29,9	366,4±38,2	341,0±52,5
АлТ, Е/л	50,2 ± 2,46	55,7 ± 5,66	54,5±3,6	57,4±7,61
ЛДГ, Е/л	3213 ± 339	3226 ± 224	3400±245	3225±524
ХЭ, Е/л	2301 ± 392*	3308 ± 414	3224±306	3384±312
Суточный диурез, мл	6,02± 0,47	6,30 ± 0,56	3,70±0,56	4,96±0,91
СКОМ, ус.ед.	4,29 ± 0,42	3,82 ± 0,43	4,57±0,44	3,56±0,47
Коэффициенты массы внутренних органов				
Печень	3,77 ± 0,18	3,79 ± 0,17	3,50±0,090	3,8 ± 0,61
Почки	0,75 ± 0,016	0,72 ± 0,028	0,66±0,008*	0,71±0,28
Селезенка	0,40 ± 0,047	0,52 ± 0,093	0,37±0,030*	0,46±0,02
Тимус	0,40 ± 0,027	0,28 ± 0,024*	0,32±0,034	0,37±0,03
Самки				
Масса тела, г: исходная	79,6 ± 2,6	73,8 ± 2,62	78,8 ± 2,47	73,7 ± 2,46
Через 4 недели	169,0 ± 3,4*	149,0 ± 7,9*	170,2 ± 4,9	185,0 ± 5,2
Прирост массы тела	89,4 ± 2,6*	75,2 ± 5,7*	91,4 ± 5,2*	111,3 ± 4,3
АсТ, Е/л	380,1 ± 34,7	357,1 ± 68,4	379,2 ± 26,4	364,4 ± 28,1
АлТ, Е/л	46,8 ± 2,6	54,0 ± 2,6*	51,1 ± 3,4	45,1 ± 2,8
ЛДГ, Е/л	2243 ± 305,9	1864 ± 299	2525 ± 218	2627 ± 216,4
ХЭ, Е/л	3424 ± 105*	5455 ± 681*	6093 ± 264*	7232,0 ± 188
Суточный диурез, мл	4,7 ± 0,8	3,2 ± 0,7	3,0 ± 0,48	3,95 ± 0,5
СКОМ, ус.ед.	2,91 ± 0,24*	2,88 ± 0,32*	2,49 ± 0,2*	3,74 ± 0,2
Коэффициенты массы внутренних органов				
Печень	4,10 ± 0,12	4,11 ± 0,02	4,02 ± 0,14	3,96 ± 0,17
Почки	0,74 ± 0,03	0,72 ± 0,02	0,74 ± 0,02	0,73 ± 0,04
Селезенка	0,53 ± 0,07	0,52 ± 0,093	0,52 ± 0,08	0,42±,055
Тимус	0,32 ± 0,04	0,41 ± 0,03*	0,35 ± 0,02	0,35 ± 0,01

Примечание: знаком «*» отмечены статистически значимые изменения ($p < 0,05$)

ных образцов наблюдалось изменение прироста массы тела, функции почек и снижение активности ХЭ. Наиболее выраженное снижение ХЭ, наблюдаемое как у самок, так и самцов, отмечено под действием образца №1, в состав которого наряду с изопропиловым входит и пропиловый спирт, обладающий наиболее выраженным кожно-резорбтивным действием (по величине DL_{50} при нанесении на кожу). Наименьшее сни-

жение ХЭ (на 15%) наблюдалось под действием образца № 4, содержащего 79% ЭС и 0,11% ЧАС, который по степени выраженности и сумме измененных показателей оказался наименее токсичным образцом.

На основании выявленных изменений можно заключить, что для самцов доза 5 г/кг любого изученного образца при кожном применении является пороговой, а для самок – действующей.

При экстраполяции экспериментальных данных на человека, с учетом коэффициента запаса 100 и условно пороговой дозы 5 г/кг, безопасная доза составит 50 мг/кг. На обработку рук детей расходуется 1,5-2 мл средства, и, следовательно, применение кожных антисептиков безопасно для детей с массой тела не менее 40 кг или в возрасте 12 лет.

Заключение. Методами *in vitro* на клетках ФЭЧ и сперматозоидах быка показана зависимость опасности антисептиков от их химического состава. Цитотоксическое действие образцов возрастало при введении в них ЧАС. Водный кожный антисептик на основе триклозана оказался на 2-4 порядка токсичнее изученных спиртосодержащих антисептиков. Использованные методы *in vitro* могут быть рекомендованы для оценки сравнительной токсичности кожных антисептиков.

Изучение кожно-резорбтивного действия на крысах-отъемышах выявило их половую чувствительность, а также максимальную токсичность образца с содержанием ПС, способного в большей степени проникать через защитный барьер кожи. Полагаем, что для оценки безопасности кожных антисептиков, рекомендованных для детей, изучение кожно-резорбтивного действия необходимо проводить на неполовозрелых лабораторных животных.

Опираясь на результаты исследования и данные литературы, рекомендуем для гигиенической обработки рук детей старше 12 лет применение кожных антисептиков на основе этилового и изопропилового спиртов без добавления ЧАС. Для обработки инъекционного и операционного полей (эпизодическое применение) рекомендуется аналогичный состав кожных антисептиков для детей всех возрастов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Toxnetdatabase: <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/m/startswi th/64-17-5;/67-63-0;/71-23-8>
2. Вредные вещества в окружающей среде. Кислородсодержащие органические соединения. Часть I / Под ред. В.А.Филова, Б.А.Ивина, Ю.И.Мусяичука. -С.-Пб.:НПО «Профессионал», 2007. -С. 15-18.
3. Kramer A. et al. Quantity of ethanol absorption after excessive hand disinfection using three commercially available hand rubs

- is minimal and below toxic levels for humans //BMC Infectious Diseases. - 2007. - Т. 7. - №. 1. - С. 117.
4. Below H. et al. Dermal and pulmonary absorption of propan-1-ol and propan-2-ol from hand rubs //American journal of infection control. - 2012. - Т. 40. - №. 3. - С. 250-257.
5. Экспресс-метод оценки общетоксического и кожно-раздражающего действия парфюмерно-косметической продукции

- in vitro* (на культуре подвижных клеток). МР № 29 ФЦ/394.ГоссанэпидслужбаРоссии.-2002 г.
6. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. // J.Immunol.Methods.- 1983.- v.65(1-2).- p.55-63.
7. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под ред.

- Р.У. Хабриева. - 2-изд. - М.: Изд. «Медицина», 2005, с.649-6
8. Atienza J.M., Zhu J., Wang X., Xu X., Abassi Y.A. Dynamic monitoring of cell adhesion and spreading on microelectronic sensor arrays. J.ofBiomol.Screen., 2005, 10, 795-805.
9. Методы лабораторных исследований и испытаний дезинфекционных средств для оценки их эффективности и безопасности, Руководство. Р 4.2643-М., 2011, с.523-525.

REFERENCES:

1. Toxnet database: <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/m/startswi th/64-17-5;/67-63-0;/71-23-8>
2. Harmful substances in the environment. Oxygen-containing organic compounds. Part I / V.A.Filova, B.A.Ivina, Yu.I.Musiychuka. eds. Pб.:NPO «Professional», 2015-18 (in Russian).
3. Kramer A. et al. Quantity of ethanol absorption after excessive hand disinfection using three commercially

- available hand rubs is minimal and below toxic levels for humans //BMC Infectious Diseases. - 2007. - Т. 7. - №. 1. - С. 117.
4. Below H. et al. Dermal and pulmonary absorption of propan-1-ol and propan-2-ol from hand rubs //American journal of infection control. - 2012. - Т. 40. - №. 3. - С. 250-257.
5. 5.A rapid method for evaluation of General toxic and skin-irritating cosmetic

- products *in vitro* (in culture of motile cells). MR № 29 Fts/3Gossanepidsluzhba Rossii.-2002(in Russian).
6. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. // J.Immunol.Methods.- 1983.- v.65(1-2).- p.55-63.
7. Manual on experimental (preclinical) study of new pharmacological substances/ Khabrieв R.U. ed. M.:

- Meditsina, 2005, 832 (in Russian).
8. Atienza J.M., Zhu J., Wang X., Xu X., Abassi Y.A. Dynamic monitoring of cell adhesion and spreading on microelectronic sensor arrays. J.ofBiomol. Screen., 2005, 10, 795-8
9. Methods of laboratory research and testing of disinfectants to assess their effectiveness and safety. Guide.P 4.2643-Moscow; 2011, 523-525 (In Russian)

M.V. Bidevkina¹, O.V. Baklanova², T.Z. Rysina¹, I.A. Suetina², O.A. Lopatina², T.N.Potapova¹, M.V. Mezentseva², A.V. Limantsev¹, L.I. Russu², Zh.P. Alekseeva¹

COMPARATIVE TOXICITY OF CERTAIN ALCOHOLS AND ALCOHOL-BASED SKIN ANTISEPTICS

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

² D.I. Ivanovsky Institute of Virology, N.F.Gamaleya Federal Research Center of Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of Russia, 123098, Moscow, Russian Federation

The cytotoxic action of skin antiseptics based on ethyl, propyl and isopropyl alcohols were investigated into the culture of human embryonic fibroblast cells using MTT-test and xCELLigence system for real-time analysis into the bull spermatozoa with registering toxicity index. The dependence of the cytotoxicity degree on the chemical composition of a preparation was established. The investigation of antiseptics skin-resorptive action mechanisms in weanling rats has shown that prepubertal females are more sensitive to the effect of alcohols compared to males. The use of skin antiseptics based on ethyl and isopropyl alcohols is recommended for hygienic treatment of children's hands.

Keywords: skin antiseptics, alcohols, cytotoxic action, cell culture, laboratory animals.

Материал поступил в редакцию 13.01.2016 г.

УДК 57.052 : 615.099

ЭСТЕРАЗНЫЙ ПРОФИЛЬ КРОВИ МЫШЕЙ ПРИ ОСТРОМ ОТРАВЛЕНИИ 2-(О-КРЕЗИЛ)-4Н-1,3,2-БЕНЗОДИОКСОФОСФОРИН-2-ОКСИДОМ

*Д.С. Прокофьева, В.И. Шмурак,
А.Е. Кривошеин, Е.А. Бодрякова,
Н.Г. Войтенко*

ФГУП «НИИ гигиены, профпатологии
и экологии человека» ФМБА
России, 188663, Ленинградская
область, Всеволожский район,
г.п. Кузьмолловский, Российская
Федерация

Проведено исследование влияния на эстеразный профиль крови мышей различных доз 2-(о-крезил)-4Н-1,3,2-бензодиоксафосфорин-2-оксида (СВDP) спустя 1 и 24 ч после его подкожного введения животным. Установлено, что СВDP не является специфичным ингибитором карбоксилэстеразы (КЭ) плазмы крови мышей, так как он в равной степени ингибирует и бутирилхолинэстеразу (БХЭ) крови. СВDP является малоэффективным ингибитором ацетилхолинэстеразы (АХЭ) сыворотки крови мышей и не обладает выраженным действием по отношению к АХЭ мембран эритроцитов, однако в больших дозах он способен снижать количество последних.

Ключевые слова: 2-(о-крезил)-4Н-1,3,2-бензодиоксафосфорин-2-оксид, сериновые эстеразы, ингибитор, мыши.

Введение. Благодаря низкой субстратной специфичности и относительно большому количеству в плазме крови и других тканях бутирилхолинэстераза (БХЭ), карбоксилэстераза (КЭ) и параоксоназа (ПОН) являются основными эстеразами, оказывающими влияние на стабильность химических соединений с эфирной связью (в том числе лекарств) в организме млекопитающих. Набор и количество этих ферментов (иначе – эстеразный профиль) у разных видов имеют существенные отличия. Одно из них – отсутствие в крови человека КЭ, в то время как в крови животных этот фермент обнаружен в больших количествах. Данный факт зачастую существенно усложняет экстраполяцию на человека фармако- и токсикологических данных, полученных в экспериментах на животных.[1]. К настоящему времени известно немало веществ, способных необратимо ингибировать сериновые эстеразы. Однако из-за большого сходства в пространственной конфигурации активных центров сериновых эсте-

раз, лишь единичные соединения отличаются не только высокой эффективностью, но и высокой селективностью по отношению к конкретному ферменту. В качестве примера можно назвать фосфорорганические отравляющие вещества, которые являются эффективными и селективными ингибиторами ацетилхолинэстеразы (АХЭ). Основной причиной того, что большинство известных ингибиторов сериновых эстераз обладают низкой селективностью, является наличие в активном центре всех сериновых гидролаз и протеаз одной и той же каталитической триады: Ser/His/Asp (Glu). Механизм ацилирования/деацилирования этих ферментов также сходен. Следовательно, эти ферменты будут в той или иной степени ингибироваться одними и теми же классами соединений.

КЭ – это семейство сериновых эстераз, ответственных за метаболизм и трансформацию большого количества ксенобиотиков, содержащих эфирную связь. В последнее десятилетие создание ингибиторов различных изо-

Прокофьева Дарья Станиславовна (Prokofieva Daria Stanislavovna), кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной токсикологии и экспериментальной терапии ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России, 188663, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация, darlja-p1@yandex.ru

Шмурак Владимир Игоревич (Shmurak Vladimir Igorevich), младший научный сотрудник лаборатории молекулярной токсикологии и экспериментальной терапии ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России, 188663, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация, vladimir.shmurak@gmail.com

Кривошеин Антон Евгеньевич (Krivoshein Anton Evgen'evich), научный сотрудник лаборатории химического моделирования ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России, 188663, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация, krivosheinanton@gmail.com

Бодрякова Елена Антоновна (Bodryakova Elena Antonovna), лаборант лаборатории молекулярной токсикологии и экспериментальной терапии ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России, 188663, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация, bodalena@yandex.ru

Войтенко Наталья Геннадиевна (Voytenko Natal'ya Gennadijevna), кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной токсикологии и экспериментальной терапии ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России, 188663, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация, ngvoitenko@gmail.com

форм КЭ привлекает все больше ученых, так как такой подход позволит модулировать метаболизм этерифицированных лекарственных средств и других ксенобиотиков, а также снижать их токсичность. На сегодняшний день известно несколько видов сильных ингибиторов КЭ, большинство из которых обладают обратимым типом ингибирования. Потенциальные ингибиторы КЭ – это, как правило, гидрофобные вещества, содержащие одно или более ароматическое кольцо и электрофильные центры (карбонил- и сульфонил-группы). Одним из наиболее известных необратимых ингибиторов КЭ является 2-(о-крезил)-4Н-1,3,2-бензодиоксафосфорин-2-оксид (СВDP). Несмотря на то, что исследования острого воздействия СВDP на активность эстераз крыс и мышей проводились неоднократно, результаты исследования динамики этого процесса немногочисленны (динамика процесса изучена слабо). Известны всего несколько работ, в которых можно найти данные по этому вопросу. Самооценочное исследование датировано 1984 годом [2]. Однако в нем была использована необоснованно высокая доза СВDP (50 мг/кг), которую п/к вводили мышам. На сегодняшний день известно [3, 4], что такая доза более чем на порядок превосходит оптимальную дозу СВDP, то есть ту дозу, которая необходима для максимального снижения активности КЭ и минимального снижения активности всех остальных эстераз крови. В исследовании 1998 г. [5] были использованы крысы, и лишь в исследовании 2010 года есть данные по динамике изменения активностей КЭ и БХЭ крови мышей спустя разные сроки после п/к введения СВDP, но только в одной дозе – 1,5 мг/кг [4]. Во всех перечисленных работах не была проведена полная оценка эстеразного профиля животных, в котором вводили СВDP. В наиболее подробном исследовании 1984 г. не была проведена оценка изменения активности БХЭ во времени при введении разных доз ингибитора, а в исследовании 2010 года не проводилась оценка активности АХЭ сыворотки крови и эритроцитов. Известно, что разные линии лабораторных животных существенно отличаются активностью эстераз сыворотки крови [6], в связи с чем, для достижения одного и того же эффекта, дозы ингибитора могут существенно варьировать для двух разных линий лабораторных животных. В опытах *in vitro* было показано [6], что величина концентрации ингибитора, которая приводит к инактивации половины молекул фермента (IC_{50}), для СВDP по отношению к КЭ сыворотки крови крыс трех разных линий отличается в несколько раз. Поскольку рабочий диапазон доз для ингибиторов сериновых эстераз может быть довольно узок ввиду их низкой специфичности,

крайне важно проводить динамическую оценку эстеразного статуса изучаемой популяции животных до и после введения им ингибитора.

Целью настоящей работы явилось исследование ингибирующей активности СВDP по отношению к основным эстеразам крови мышей в зависимости от дозы ингибитора и времени отбора проб.

Материалы и методы исследования. В работе были использованы 63 самки белых нелинейных мышей массой 20-22 г. Перед началом эксперимента животные были распределены случайным образом по 9 группам. При работе были соблюдены требования по гуманному обращению с животными. Условия содержания экспериментальных животных соответствовали нормативному документу «Об утверждении правил лабораторной практики» (Приказ Минздрава России от 23.08.2010 г. №708н).

Животным вводили СВDP, синтезированный по методу, описанному в работе Nomeir A.A. и Abou-Donia M.B. в 1986 г. [7] п/к в дозах 1, 2, 4, 8 мг/кг. В качестве растворителя использовали 5% раствор этилового спирта в пропиленгликоле. Контрольной группе вводили эквивалентный объем растворителя. Спустя 1 или 24 ч животных выводили из эксперимента путем декапитации, после чего отбирали аликвоту цельной крови для измерения активности АХЭ эритроцитов. Из остальной крови получали сыворотку, которую хранили при -80°C и анализировали в течение 2-х недель с момента окончания эксперимента.

В работе были использованы традиционные методы анализа активности сериновых эстераз с незначительными модификациями [5, 8]. При определении активностей БХЭ в качестве субстрата использовали бутирилтиохолин. Для оценки активности КЭ использовали два субстрата: α -нафтилацетат (α -НА) и *p*-нитрофенилацетат (*p*-НФА). Активность АХЭ эритроцитов измеряли после двукратной отмывки клеток от плазмы крови, используя в качестве субстрата ацетилтиохолин. Оценку активности АХЭ сыворотки крови проводили в присутствии ингибитора БХЭ iso-OMPA, поскольку известно, что БХЭ способна активно гидролизовать ацетилтиохолин. Активность ПОН измеряли с использованием параоксона в присутствии 2мМ CaCl_2 в 0,1М буферном растворе Tris-HCl pH 8,0 [9]. Измерение количества продуктов ферментативных реакций проводили в кинетическом режиме в присутствии избытка субстрата. После проведения расчета скоростей образования продуктов вычисляли значения активностей соответствующих ферментов в экспериментальных и контрольных пробах, используя известные значения коэффициентов молярной

экстинкции продуктов. В ходе вычислений учитывали самопроизвольный распад субстрата. Данные в таблицах представлены в виде % активности, рассчитанного по отношению к значениям в контрольной группе.

Количество эритроцитов в цельной крови считали в камере Горяева.

В качестве объекта исследования для экспериментов *in vitro* была использована пулированная сыворотка 10 мышей. К объекту исследования добавляли стоковые растворы СВDP в 10 мМ фосфатном буферном растворе pH 7.4, содержащего 137 мМ NaCl и 2,7 мМ KCl, в объеме соотношении 1:9, после чего пробы сразу перемешивали. Концентрации СВDP в стоковых растворах были в 10 раз выше конечных концентраций веществ в пробах и составляли от 2,5 до 150 мкМ. Пробы инкубировали при 37°C в течение 1, 4 и 24 ч. По истечении указанного времени пробы интенсивно перемешивали и из них отбирали аликвоты для незамедлительного определения активности БХЭ и КЭ. В качестве контрольных проб использовали образцы исследования, к которым вместо растворов СВDP добавляли соответствующий объем фосфатного буферного раствора.

Статистическую обработку полученных данных выполняли с помощью программного обеспечения GraphPadPrizm 5.0. Перед анализом данных проводили проверку нормальности их распределения (тест Колмогорова-Смирнова). Данные подчинялись нормальному распределению, поэтому для дальнейшей обработки использовали параметрический однофакторный дисперсионный анализ и тест Даннета (частный случай поправки Бонферрони для сравнения нескольких групп с контролем). Для оценки характера и степени совместного влияния двух факторов (дозы и времени отбора проб) на исследуемые параметры применяли двухфакторный дисперсионный анализ. Критический уровень значимости (P) при проверке статистических гипотез принимали равным 0,05. Данные на рисунках представлены в виде «среднее ± стандартное отклонение».

Результаты и обсуждение. В результате проведенной работы было установлено, что снижение активности большинства исследованных показателей спустя 1 ч после введения животным СВDP в диапазоне доз от 1 до 8 мг/кг происходит дозозависимым образом. Изменения активности эстераз через сутки после введения СВDP по сравнению с 1 ч имеют неодинаковый характер (табл. 1-2). Спустя сутки активности КЭ и БХЭ статистически значимо повышаются по сравнению с этими же показателями на раннем сроке в диапазоне доз 2-8 мг/кг. Для самой низкой дозы 1 мг/кг можно отметить наличие

тенденции к повышению активности КЭ и БХЭ с течением времени. Несмотря на это, для всех доз ингибитора значения указанных активностей продолжают статистически значимо отличаться от контрольных значений даже спустя сутки после введения вещества. Известно, что БХЭ и АХЭ человека необратимо ингибируется СВDP [10]. Установлено, что необратимость ингибирования является следствием чрезвычайно быстрого «старения» фермент-ингибиторного комплекса. Таким образом, можно предположить, что повышение активности БХЭ с течением времени обусловлено ее синтезом в печени. Причем эта функция, по всей видимости, активизируется при снижении доли активных ферментов в крови животных до некоего критического значения, которое лежит в диапазоне от 20% до 60% базовой активности. Для КЭ это предположение также может быть справедливо. Однако однозначных свидетельств необратимости ингибирования БХЭ и КЭ крови мышей СВDP в литературе нет, поэтому для проверки выдвинутой гипотезы мы провели эксперимент *in vitro* с пулированной сывороткой мышей, к которой добавляли разные количества ингибитора. Концентрации ингибитора подбирали таким образом, чтобы охватить весь диапазон возможного изменения ферментативной активности. Через несколько временных интервалов производили отбор проб и определяли активности интересующих ферментов. Оказалось, что ни БХЭ, ни КЭ сыворотки крови мышей спонтанно не реактивируется, по крайней мере, в течение 24 ч после взаимодействия с ингибитором, поскольку статистически значимых отличий между контрольной пробой и опытными пробами обнаружено не было (рис. 1 и 2). Таким образом, можно заключить, что *in vivo* повышение активности БХЭ и КЭ крови мышей с течением времени после введения ингибитора обусловлено их синтезом *de novo* печени.

Активность АХЭ сыворотки дозозависимым образом снижается при остром отравлении мышей СВDP. Однако это снижение менее выражено по сравнению с его действием на активность БХЭ и КЭ. Статистически значимые отличия экспериментальных и контрольных значений были установлены для диапазона доз 2-8 мг/кг. Также было установлено, что активность АХЭ сыворотки спустя 1 ч после введения СВDP не имеет статистически значимых отличий от значения того же параметра, измеренного через сутки после воздействия, то есть в течение 24 часов активности АХЭ сыворотки не начинает восстанавливаться. Наблюдаемый эффект вполне предсказуем, учитывая необратимый характер ингибирования [10] и тот факт, что источ-

Таблица 1

Зависимость значений ферментативной активности КЭ и БХЭ крови мышей от дозы СВDP, измеренных спустя 1 и 24 ч после воздействия. Величины активностей представлены в процентном отношении к контрольным значениям, (n =7)

Доза, мг/кг	КЭ (субстрат α -НА)		КЭ (субстрат p-НФА)		БХЭ	
	1 ч	24 ч	1 ч	24 ч	1 ч	24 ч
0	100±7	100±7	100±9	100±9	100±18	100±18
1	80±13*	78±6*	62±16*	63±7*	63±16*	71±10*
2	28±16*	65±5*†	17±11*	50±5*†	16±8*	50±5*†
4	7±3*	56±6*†	5±2*	42±6*†	3±1*	32±3*†
8	5±1*	57±10*†	2±1*	39±9*†	1±1*	23±6*†

Примечание: * – статистически значимые отличия экспериментальных групп от контрольной группы; † – статистически значимые отличия между двумя временными интервалами для каждой дозы по результатам двухфакторного дисперсионного анализа.

Таблица 2

Зависимость значений ферментативной активности ПОН и АХЭ сыворотки и мембран эритроцитов от дозы СВDP, измеренных спустя 1 и 24 ч после воздействия. Величины активностей представлены в процентном отношении к контрольным значениям, (n =7)

Доза, мг/кг	АХЭ сыворотки		АХЭ эритроцитов		ПОН	
	1 ч	24 ч	1 ч	24 ч	1 ч	24 ч
0	100±12	100±12	100±16	100±16	100±19	100±19
1	96±18	107±10	102±13	85±15	142±29*	102±25†
2	76±10*	81±6*	108±27	83±17	134±25	118±20
4	59±8*	68±9*	106±20	71±13*†	110±18	111±15
8	60±11*	58±8*	84±16	73±12*	93±35	94±16

Примечание: * – статистически значимые отличия экспериментальных групп от контрольной группы; † – статистически значимые отличия между двумя временными интервалами для каждой дозы по результатам двухфакторного дисперсионного анализа.

ник АХЭ в сыворотке, в отличие от БХЭ и КЭ, до сих пор неизвестен.

С другой стороны, активность АХЭ, локализованной на мембранах эритроцитов, через 24 ч после введения ингибитора имеет тенденцию к снижению по сравнению с тем же показателем для 1 ч, и на дозе 4 мг/мл это снижение носит статистически значимый характер. Двухфакторный дисперсионный анализ этих данных показал, что оба фактора (время и доза) статистически значимо влияют на активность АХЭ эритроцитов, причем степень влияния времени ($P=0.0002$) носит более выраженный характер по сравнению с дозой ($P=0.0321$). Причиной наблюдаемого эффекта может быть изменение количества эритроцитов, а также изменения структурных мембраны. Для проверки первой

гипотезы было выполнено дополнительное исследование. На рисунке 3 приведены данные об изменении количества эритроцитов с течением времени после введения животным СВDP в дозе 4 мг/кг. Оказалось, что спустя 1 ч количество эритроцитов в крови животных незначительно повышается, а через сутки статистически значимо снижается по сравнению с контрольным значением. Следовательно, незначительное повышение активности АХЭ мембран эритроцитов спустя 1 ч после введения животным СВDP связано с повышением количества эритроцитов в крови, в то время как статистически значимое снижение активности АХЭ мембран эритроцитов обусловлено снижением количества эритроцитов в крови животных на этой временной точке. Таким образом, можно заклю-

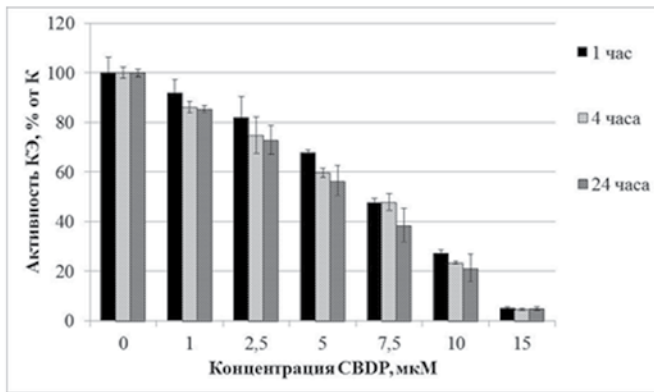


Рис. 1. Изменение активности КЭ (субстрат р-НФА) в присутствии CBDP в опытах *in vitro* в зависимости от концентрации ингибитора и времени отбора проб для анализа.

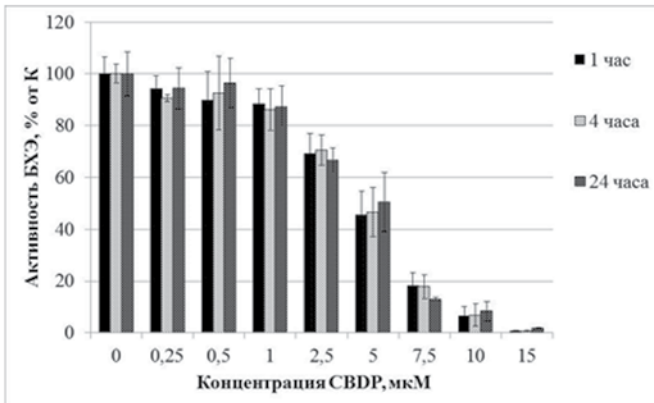


Рис. 2. Изменение активности БХЭ в присутствии CBDP в опытах *in vitro* в зависимости от концентрации ингибитора и времени отбора проб для анализа.

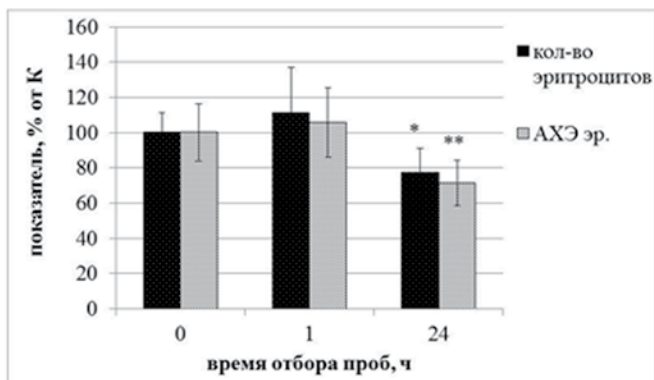


Рис.3. Изменение количества эритроцитов и активности АХЭ их мембран в крови мышей после п/к введения CBDP в дозе 4 мг/кг

чить, что CBDP не оказывает ингибирующего действия на АХЭ мембран эритроцитов. С этим утверждением не согласуются данные, полученные на максимальной использованной дозе ингибитора. Вероятно, это связано с тем, что в этом случае снижение количества эритроцитов в крови наступило в более ранние сроки, что не позволило проследить описанную для меньших доз динамику изменений. Снижение количества эритроцитов при остром отравлении CBDP может быть вызвано фазовым снижением гематокрита. Однако данное предположение требует проведения дополнительных исследований.

Обнаружено статистически значимое повышение активности ПОН спустя 1 ч после введения CBDP в дозе 1 мг/кг (табл. 2). Дальнейшее увеличение дозы снижает наблюдаемый эффект до уровня контрольных значений активности. Спустя сутки после введения CBDP уровень активности ПОН сыворотки крови соответствует контрольным значениям для всех использованных доз ингибитора.

Таким образом, можно утверждать, что CBDP не является специфическим ингибитором КЭ крови мышей, как это принято было считать до недавнего времени [4, 5, 12, 13]. В то же время необходимо отметить, что на активность АХЭ крови мышей CBDP влияет в меньшей степени, чем на активность БХЭ и КЭ. Следовательно, CBDP в дозе 4 мг/кг можно использовать в качестве соединения полностью устраняющего активность БХЭ и КЭ крови мышей, но не влияющего на активность АХЭ мембран эритроцитов. Также данное соединение можно применять в качестве ингибитора эстераз *in vitro*. Необходимо отметить, что в предыдущей работе [11] нами было показано, что для крыс ситуация немного иная. CBDP может проявлять относительную специфичность в отношении КЭ крови крыс по сравнению с БХЭ. Однако это, скорее всего, является следствием не только и не столько специфичности, но главным образом другого количественного соотношения эстераз крови мышей и крыс. Таким образом, результаты, полученные при использовании ингибитора сериновых эстераз на одном виде лабораторных животных, нельзя переносить на другой вид без проведения хотя бы пилотных экспериментов. Также мы обнаружили снижение количества эритроцитов спустя сутки после введения CBDP и повышение активности ПОН на меньшей дозе ингибитора. Объяснение причин этих явлений требует проведения дальнейших исследований.

Заключение. Введение мышам CBDP сопровождается дозозависимым снижением ак-

тивности основных сериновых эстераз крови. Спустя сутки после воздействия эти показатели все еще статистически значимо отличаются от контрольных значений, что свидетельствует о том, что 24 часов не достаточно для полного восстановления активности КЭ и БХЭ крови мышей при применении доз СВDP от 1 мг/кг до 8 мг/кг. На активность АХЭ сыворотки СВDP оказывает аналогичное, но менее вы-

раженное действие, причем в отличие от КЭ и БХЭ активность АХЭ сыворотки за 24 часа практически не меняется при любой дозе ингибитора. Снижение активности АХЭ эритроцитов через сутки после введения ингибитора, равно как и повышение активности ПОН на минимальной дозе СВDP, трудно объяснить с точки зрения имеющейся на настоящий момент в литературе информации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bahar F.G., Imai T. Aspirin Hydrolysis in Human and Experimental Animal Plasma and the Effect of Metal Cations on Hydrolase Activities. *Drug Metab Dispos.* 2013; 41:1450-1456.
2. Clement J.G. Importance of aliesterase as a detoxification mechanism for soman (piinacolylmethylphosphonofluoridate) in mice. *Biochemical Pharmacology.* 1984; 33 (23): 3807-3811.
3. Maxwell D.M., Brecht K.M., O'Neill B.L. The effect of carboxylesterase inhibition on interspecies differences in soman toxicity. *Toxicol. Lett.* 1987;39(1):35-42.
4. Garrett T.L., Rapp C.M., Grubbs R.D., Schlager J.J., Lucot J.B. A murine model for sarin exposure using the carboxylesterase inhibitor CBDP. *Neurotoxicology.* 2010; 31: 502-508.

5. Yang Z.P., Dettbarn W.D. Prevention of tolerance to the organophosphorus anticholinesterase paraoxon with carboxylesterase inhibitors. *BiochemPharmacol.* 1998; 55(9):1419-1426.
6. Clement J.G., Erhardt N. Serum carboxylesterase activity in various strains of rats: sensitivity to inhibition by CBDP (2-/o-cresyl/4H:1:3:2-benzodioxaphosphorin-2-oxide). *Arch. Toxicol.* 1990; 64(5): 414- 416.
7. Nomeir A.A., Abou-Donia M.B. Studies on the metabolism of neurotoxic tri-o-cresyl phosphate. *Toxicology.* 1986; 38: 1-13.
8. Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V.Jr., Feather-Stone R.M. A new and rapid colorimetric determination of

acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 1961. V.7.: 88-95.
9. Курдюков И.Д., Дубровский Я.А., Бабаков В.Н., Гончаров Н.В. Исследование полиморфизмов параоксоназы-1 у населения Кировской области. *Токсикологический Вестник.* 2012. №4, С. 13-18.
10. Carletti E., Schopfer L.M., Colletier J.P., Froment M.T., Nachon F., Weik M., Lockridge O., Masson P. Reaction of Cresyl Saligenin Phosphate, the Organophosphorus Agent Implicated in Aertotoxic Syndrome, with Human Cholinesterases: Mechanistic Studies Employing Kinetics, Mass Spectrometry, and X-ray Structure Analysis. *Chem. Res. Toxicol.* 2011; 24: 797 - 808.
11. Прокофьева Д.С., Кривошеин А.Е.,

Шмурак В.И., Бодрякова Е.А., Войтенко Н.Г. Определение оптимальной дозы 2-(о-крезил)-4Н-1,3,2-бензодioxофосфорин-2-оксида для селективного ингибирования карбоксилэстераз сыворотки крови крыс *in vivo*. Ученые записки Орловского государственного университета. 2014;7(63): 255-256.
12. Chambers J.P., Hartgraves S.L., Murphy M.R., Wayner M.J., Kumar N., Valdes J.J. Effects of three reputed carboxylesterase inhibitors upon rat serum esterase activity. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 1991; 15(1):85-88.
13. Shapira S., Kadar T., Cohen G., Chapman S., Raveh L. Effects of CBDP and MEPQ on the toxicity and distribution of [3H]-soman in mice. *Arch Toxicol.* 1990;64(8):663-668.

REFERENCES:

1. Bahar F.G., Imai T. Aspirin Hydrolysis in Human and Experimental Animal Plasma and the Effect of Metal Cations on Hydrolase Activities. *Drug Metab Dispos.* 2013; 41:1450-1456.
2. Clement J.G. Importance of aliesterase as a detoxification mechanism for soman (piinacolylmethylphosphonofluoridate) in mice. *Biochemical Pharmacology.* 1984; 33 (23): 3807-3811.
3. Maxwell D.M., Brecht K.M., O'Neill B.L. The effect of carboxylesterase inhibition on interspecies differences in soman toxicity. *Toxicol. Lett.* 1987;39(1):35-42.
4. Garrett T.L., Rapp C.M., Grubbs R.D., Schlager J.J., Lucot J.B. A murine model for sarin exposure using the carboxylesterase inhibitor CBDP. *Neurotoxicology.* 2010; 31: 502-508.

5. Yang Z.P., Dettbarn W.D. Prevention of tolerance to the organophosphorus anticholinesterase paraoxon with carboxylesterase inhibitors. *BiochemPharmacol.* 1998; 55(9):1419-1426.
6. Clement J.G., Erhardt N. Serum carboxylesterase activity in various strains of rats: sensitivity to inhibition by CBDP (2-/o-cresyl/4H:1:3:2-benzodioxaphosphorin-2-oxide). *Arch. Toxicol.* 1990; 64(5): 414- 416.
7. Nomeir A.A., Abou-Donia M.B. Studies on the metabolism of neurotoxic tri-o-cresyl phosphate. *Toxicology.* 1986; 38: 1-13.
8. Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V.Jr., Feather-Stone R.M. A new and rapid colorimetric determination of

acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 1961. V.7.: 88-95.
9. Kurdyukov I.D., Dubrovskiy Ya. A., Babakov V.N., Goncharov N.V. The study of polymorphisms of paraoxonase-1 in the population of the Kirov region. *Toksikologicheskiy Vestnik.* 2012. №4, С. 13-18. (in Russian).
10. Carletti E., Schopfer L.M., Colletier J.P., Froment M.T., Nachon F., Weik M., Lockridge O., Masson P. Reaction of Cresyl Saligenin Phosphate, the Organophosphorus Agent Implicated in Aertotoxic Syndrome, with Human Cholinesterases: Mechanistic Studies Employing Kinetics, Mass Spectrometry, and X-ray Structure Analysis. *Chem. Res. Toxicol.* 2011; 24: 797 - 808.
11. Prokofieva D.S., Krivoshein

A.E., Shmurak V.I., Bodryakova E.A., Voitenko N.G. Estimation of effective dose of 2-(O-cresyl)-4H-1,3,2-benzodioxaphosphorin-2-oxide for selective inhibition of rat serum carboxylesterases *in vivo*. *Uchenye zapiski Orlovskogo gosudarstvennogo universiteta.* 2014; 7(63): 255-256. (in Russian).
12. Chambers J.P., Hartgraves S.L., Murphy M.R., Wayner M.J., Kumar N., Valdes J.J. Effects of three reputed carboxylesterase inhibitors upon rat serum esterase activity. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 1991; 15(1):85-88.
13. Shapira S., Kadar T., Cohen G., Chapman S., Raveh L. Effects of CBDP and MEPQ on the toxicity and distribution of [3H]-soman in mice. *Arch Toxicol.* 1990;64(8):663-668.

D.S. Prokofieva, V.I. Shmurak, A.E. Krivoshein, E.A. Bodryakova, N.G. Voitenko

BLOOD ESTERASE PROFILE IN MICE AT ACUTE INTOXICATION BY 2-(O-CRESYL)-4H-1,3,2-BENZODIOXAPHOSPHORIN-2-OXIDE

Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology, Federal Medical Biological Agency, 188663, settlement Kuz'molovsky, Vsevolozhsk District, Leningrad Region, Russian Federation

The influence of 2-(o-cresyl)-4H-1,3,2-benzodioxaphosphorin-2-oxide (CBDP) on the blood esterase profile in mice was studied at different doses an hour and 24 h after its subcutaneous administration to animals. It is established that CBDP is not a specific carboxyl esterase inhibitor in mice blood serum as it equally inhibits blood butyrylcholinesterase as well. CBDP is a low effective acetylcholinesterase inhibitor in mice blood serum and does not pose an expressed effect in respect to acetylcholinesterase in erythrocytes membranes, however in high doses it is able to lower their amount.

Keywords: 2-(o-cresyl)-4H-1, 3, 2-benzodioxaphosphorin-2-oxide, serine esterase, inhibitor, mice.

Переработанный материал поступил в редакцию 08.02.2016 г.

УДК 615.281 :573.7

ВЛИЯНИЕ ХРОНОБИОЛОГИЧЕСКИХ РИТМОВ НА ТОКСИЧНОСТЬ ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНОГО ПРЕПАРАТА «ИЗОНИАЗИД» В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТА

К.И. Усов^{1,2}, Т.А. Гуськова³, Г.Г. Юшков¹,
А.В. Машанов¹

¹НИИ Биофизики, лаборатория токсикологических испытаний и исследований ИЛЦ ФГБОУ ВО «Ангарский государственный технический университет», 665835, г. Ангарск, Российская Федерация

²ГБОУ ВПО Иркутский государственный медицинский университет Минздрава России, кафедра фармакологии, 664003, г. Иркутск, Российская Федерация

³Некоммерческое партнерство содействия здравоохранению «Научный центр контроля качества», 115191, г. Москва, Российская Федерация

Статья содержит результаты экспериментальных хронотоксикологических исследований противотуберкулезного препарата «Изониазид», позволившие установить факт снижения токсичности при введении препарата в вечернее время суток.

Ключевые слова: противотуберкулезный препарат, изониазид, хронобиология, хронобиологические ритмы, рациональная химиотерапия, экспериментальные исследования.

Введение. Согласно классификации Международного союза по борьбе с туберкулезом препарат «Изониазид» относится к препаратам первого ряда и является наиболее эффективным в лечении различных форм туберкулеза [9], но наряду с этим применение препарата сопряжено с возможностью возникновения побочных реакций, в том числе токсического характера (нейро-, гепато-, нефро-, кардиотоксичность и др.) [1, 5, 6, 16]. Эти побочные реакции напрямую отражаются на состоянии соматического и психического здоровья человека, находящегося как на этапе химиотерапии, так и после завершения курса (курсов) лечения данным препаратом. В некоторых случаях наличие побочных реакций, возникающих при приеме противотуберкулезных препаратов, отрицательно влияет на принцип непрерывности организации химиотерапии туберкулеза и зачастую приводит к ее срыву, что провоцирует микобактерии к развитию лекарственной резистентности [10].

Известно, что действие лекарственного вещества на организм отличается высокой вариабельностью и зависит от множества как внутренних, так и внешних факторов. Одним из наиболее ярких, влияющих на выраженность фармакологического эффекта, выступает фактор времени суток [14]. При разработке рациональных, оптимальных программ лекарственной терапии важен и хронотоксикологический подход, с применением которого возможно значительно снизить токсичность препаратов и тем самым повысить избирательность терапевтического действия [3]. Наиболее значимыми для лекарственной токсикологии являются суточные или циркадные ритмы. Еще в 1931 г., Адсен с соавторами в опытах на мышах доказали, что судорожная активность инсулина в вечерние часы значительно ниже, чем в дневные. Зависимость токсичности от времени отмечена для ряда нестероидных противовоспалительных, противоопухолевых препаратов, влияющих на гуморальную регуляцию [2].

Усов Константин Ильич (Usov Konstantin Illich), кандидат биологических наук, доцент, заведующий лабораторией токсикологических испытаний и исследований ИЛЦ НИИ Биофизики, ФГБОУ ВО «Ангарский государственный технический университет», 665830, Иркутская область, г. Ангарск, konstausov@yandex.ru

Гуськова Татьяна Анатольевна (Guskova Tatijana Anatolievna), член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор, заместитель Председателя Всероссийской общественной организации токсикологов, Некоммерческое партнерство содействия здравоохранению «Научный центр контроля качества», tagus@rambler.ru

Юшков Геннадий Георгиевич (Jushkov Gennadij Georgievich), кандидат медицинских наук, доцент, научный сотрудник лаборатории токсикологических испытаний и исследований ИЛЦ НИИ Биофизики, ФГБОУ ВО «Ангарский государственный технический университет», prof_ushkov@mail.ru;

Машанов Антон Владимирович (Mashanov Anton Vladimirovich), кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории токсикологических испытаний и исследований ИЛЦ НИИ Биофизики, ФГБОУ ВО «Ангарский государственный технический университет», mashan_rip@mail.ru.

Цель работы – оценить клинику острого отравления и продолжительность жизни крыс, изучить кумуляцию противотуберкулезного препарата «Изониазид» (производства ОАО «Фармасинтез», г. Иркутск) при введении в утренние и вечерние часы.

Материалы и методы исследования. В соответствии с действующими нормативными документами и методическими рекомендациями, принятыми на территории РФ для проведения экспериментальных токсикологических исследований, а также на основе многолетнего экспериментального опыта сотрудников лаборатории токсикологических испытаний и исследований ИЛЦ НИИ Биофизики ФГБОУ ВО «АнГТУ» по изучению противотуберкулезных препаратов, в качестве экспериментально-биологической модели были выбраны белые нелинейные крысы (самцы, самки) [11, 12, 15]. Критериями включения животных в эксперимент являлись: заключение Службы ветеринарии Иркутской области, отсутствие видимых проявлений заболеваний, однородность по массе тела, в ряде случаев – по анализу периферической крови и некоторым другим показателям в соответствии с принятыми в лаборатории стандартными операционными процедурами и паспортом состояния лабораторных животных. Все животные содержались в условиях специализированной экспериментально-биологической клиники (вивария) (ветеринарное удостоверение 238 № 0019713).

Эксперименты были проведены в соответствии с этическими требованиями по работе с экспериментальными животными, изложенными в следующих нормативно-правовых документах: «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных»

(приложение к приказу МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г.) [7], «Правила лабораторной практики» (приложение к приказу МЗ РФ № 708н от 23.08.2010 г.) [8] и разрешены локальным этическим комитетом.

Параметры острой токсичности устанавливали по методу Кербера [4], на белых крысах массой тела 180-200 г. Рандомизацию животных на группы проводили по принципу диапазона доз и полу. Было сформировано 10 групп животных для введения в 10 ч 00 мин утра и 10 групп животных для введения в 22 ч 00 мин вечера. Каждая группа для введения состояла из 12 крыс ($n = 6$ М, $n = 6$ F) и представляла отдельную серию эксперимента.

Препарат «Изониазид®» (форма выпуска: таблетки, 0,3 г) испытывали в дозах 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000 мг/кг с шагом наращивания дозы на 100 мг. Животным вводили препарат однократно, внутрижелудочно в виде суспензии с дистиллированной водой с помощью металлического атравматичного зонда. Перед введением препарата оболочка таблеток убиралась, ядро растиралось в ступке. Однократный объем вводимой суспензии для крыс не превышал 5 мл [13]. Наблюдение за животными вели в течение 14 суток [12].

При изучении кумуляции животным ежедневно, внутрижелудочно вводили $1/5$ от DL_{50} , $1/10$ от DL_{50} для препарата «Изониазид®». Для каждой из доз препарата была сформирована одна подопытная группа животных ($n = 10$ М, $n = 10$ F) – введение в 10 ч 00 мин утра, и вторая подопытная группа ($n = 10$ М, $n = 10$ F) – введение в 22 ч 00 мин вечера. Наряду с подопытными группами были сформированы контрольные группы (вводили воду в эквивалентном объеме) и группа интактных жи-

Таблица 1

Среднесмертельные и смертельные дозы препарата «Изониазид»

Время введения препарата «Изониазид»	DL_{50} , мг/кг		DL_{100} , мг/кг	
	Крысы М	Крысы F	Крысы М	Крысы F
10 ч 00 мин утра	1667 ± 49	1683 ± 49	1800	1800
22 ч 00 мин вечера	1800 ± 28	1800 ± 28	1900	1900
Коэффициент достоверности (t)	2,36	2,07		

вотных. Все эксперименты проведены в зимний период.

Результаты и обсуждение. Полученные данные токсикометрии острого отравления при введении препарата «Изониазид» в утренние и вечерние часы суток приведены в таблице 1.

При сравнении установленных величин DL_{50} , приведенных в таблице 1, критерий t (коэффициент достоверности) более или равен 2 ($t \geq 2$), что соответствует вероятности безошибочного прогноза P , равному или более 95 % ($P \geq 95$ %), следовательно разность можно считать статистически достоверной. Процентное повышение DL_{50} при введении в 22 ч 00 мин от DL_{50} при введении препарата в 10 ч 00 мин для крыс-М составило 8 %, для крыс-F – 7 %. Из данных, представленных в таблице 1, следует, что при введении препарата «Изониазид» в вечернее время суток величина DL_{100} , характерная для введения в утренние часы, сместилась в сторону DL_{50} , что свидетельствует о лучшей переносимости препарата в вечернее время суток и о достоверности факта хронотоксичности препарата «Изониазид» в условиях однократного перорального введения.

Полученные достоверные данные влияния хронобиологических ритмов на среднюю продолжительность жизни крыс после введения препарата «Изониазид» в дозах DL_{50} и DL_{100} представлены в таблице 2.

Гибель животных в утренние часы наступала быстрее, чем при введении препарата в вечерние часы. В целом в клинической картине острого отравления преобладали признаки расстройства функций нервной системы, свя-

занного, по-видимому, с тем, что препарат хорошо проникает через гематоэнцефалический барьер. Симптоматика проявлялась двумя фазами: фаза двигательного торможения (первая фаза) сопровождалась снижением двигательной активности, «замиранием» животных, заторможенной реакцией на свет, звук (продолжительность фазы – 15-40 мин в зависимости от вводимой дозы); фаза двигательного возбуждения, эпистатуса (вторая фаза) возникала вследствие снижения синтеза тормозного нейромедиатора ГАМК путем ингибирования пиридоксальфосфат-зависимого фермента декарбоксилазы глутаминовой кислоты [17] и характеризовалась повышением рефлекторной возбудимости на свет, звук, развитием преимущественно клонических судорог, максимальная продолжительность фазы – 70 мин (при введении в 10 ч 00 мин) и 90 мин (при введении в 22 ч 00 мин). Гибель животных наступала, как правило, на 1-е сутки, и именно в состоянии эпистатуса на 2-4 судорожный припадок. Выжившие животные в течение первых часов после воздействия постепенно выходили из состояния визуально определяемой интоксикации и к 3-м суткам внешне не отличались от контроля, не отказывались от воды и корма. На вскрытии павших животных – значительные гемодинамические расстройства, полнокровие внутренних органов, гемorragии в легких, отечность тканей, в том числе головного мозга. У двух павших животных (1М, 1F) при введении препарата в дозе 1700 мг/кг в 22 ч 00 мин диагностирован парез желудка.

Таблица 2

Средняя продолжительность жизни крыс после однократного введения препарата «Изониазид» в дозах DL_{50} и DL_{100}

Время введения препарата «Изониазид»	Средняя продолжительность жизни крыс (в минутах)			
	DL_{50} , мг/кг		DL_{100} , мг/кг	
	Крысы М	Крысы F	Крысы М	Крысы F
10 ч 00 мин утра	29 ± 4	33 ± 5	25 ± 5	25 ± 2
22 ч 00 мин вечера	56 ± 7	55 ± 7	36 ± 2	38 ± 5
Коэффициент достоверности (t)	3,38	2,56	3,05	2,41

Таблица 3

Динамика летальности крыс при ежедневном пероральном применении препарата «Изониазид» в течение 5 дней с последующим определением DL_{50} (n = 10)

Время введения препарата, пол крыс	Длительность введения препарата – 5 дней			Однократное введение препарата после 5-дневного применения	
	Доза препарата в сутки	Суммарная доза препарата	Летальность крыс	DL_{50} на 7-е сутки от начала эксперимента	Летальность крыс
10 ч 00 мин утра, М	1/5 от DL_{50}	1667 мг/кг	0/10	1667 мг/кг (1400÷1900)	9/10
10 ч 00 мин утра, F	1/5 от DL_{50}	1683 мг/кг	0/10	1683 мг/кг (1400÷1900)	10/10
22 ч 00 мин вечера, М	1/5 от DL_{50}	1800 мг/кг	0/10	1800 мг/кг (1700÷1867)	8/10
22 ч 00 мин вечера, F	1/5 от DL_{50}	1800 мг/кг	0/10	1800 мг/кг (1700÷1867)	8/10

Результаты по изучению кумуляции препарата «Изониазид» при введении в утренние и вечерние часы суток представлены в таблице 3.

Признаков интоксикации при введении препарата в дозе 1/5 от DL_{50} (в течение 5 суток) и 1/10 от DL_{50} (в течение 10 суток) визуально не обнаружено: животные свободно перемещались в клетке; цианоз, судороги, патологические выделения из естественных отверстий, пальпаторно определяемые уплотнения отсутствовали; рефлексы живые, шерсть блестящая, опрятная; зубы сохранены, молочные железы самок без особенностей. Как видно из данных таблиц 3 и 4, введение препарата «Изониазид» в дозах 1/5 от DL_{50} и 1/10 от DL_{50} не вызывало летальности по окончании введения, а также через сутки по окончании срока ежедневного введения. Показатели DL_{50} при однократном введении изониазида в возрастающих дозах после 5-ти или 10-дневного применения препарата в дозах 1/5 от DL_{50} и 1/10 от DL_{50} не отличались от показателей, полученных при оценке острой токсичности изониазида на интактных животных (табл.1). Однако четко прослеживается различие в показателях острой токсичности при введении препарата в разное время суток. Так, введение изониазида в дозе DL_{50} животным, ранее

ежедневно получавшим препарат в течение 5 суток в дозе 1/5 от DL_{50} , приводило к летальности 90-100 % крыс при введении в утренние часы и к летальности 80 % крыс при введении в вечернее время. Однократное введение изониазида экспериментальным группам крыс в возрастающих дозах после ежедневного применения препарата в течение 10 суток в дозе 1/10 от DL_{50} приводило к более низкой летальности при введении препарата в вечернее время суток (50 %), чем в утренние часы (70 %), что свидетельствует о меньшей токсичности изониазида при введении крысам в вечернее время.

Средняя продолжительность жизни после введения DL_{50} животным, получавшим в течение 5 суток 1/5 от DL_{50} и в течение 10 суток 1/10 от DL_{50} , также была выше при введении препарата в вечернее время суток (табл. 5).

Клиническая картина интоксикации развивалась однотипно, как и при однократном введении в эксперименте по установлению параметров токсичности, гибель животных наступала в состоянии эпистатуса в утренние часы быстрее, чем при введении препарата в вечернее время суток.

Заключение. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о влиянии хронобио-

Таблица 4

Динамика летальности крыс при ежедневном пероральном применении препарата «Изониазид» в течение 10 дней с последующим определением DL₅₀ (n = 10)

Время введения препарата, пол крыс	Длительность введения препарата - 10 дней			Однократное введение препарата после 10-дневного применения	
	Доза препарата в сутки	Суммарная доза препарата	Летальность крыс	DL ₅₀ на 12-е сутки от начала эксперимента	Летальность крыс
10 ч 00 мин утра, М	1/10 от DL ₅₀	1667 мг/кг	0/10	1667 мг/кг (1400±1900)	7/10
10 ч 00 мин утра, F	1/10 от DL ₅₀	1683 мг/кг	0/10	1683 мг/кг (1400±1900)	7/10
22 ч 00 мин вечера, М	1/10 от DL ₅₀	1800 мг/кг	0/10	1800 мг/кг (1700±1867)	5/10
22 ч 00 мин вечера, F	1/10 от DL ₅₀	1800 мг/кг	0/10	1800 мг/кг (1700±1867)	5/10

Таблица 5

Средняя продолжительность жизни крыс после введения DL50 препарата «Изониазид» предварительно получавших ежедневно 1/5 от DL₅₀ и 1/10 от DL₅₀ (n = 10)

Время введения препарата «Изониазид»	Средняя продолжительность жизни крыс (в минутах)			
	Группа животных получавших 1/5 от DL ₅₀		Группа животных получавших 1/10 от DL ₅₀	
	Крысы М	Крысы F	Крысы М	Крысы F
10 ч 00 мин утра	32 ± 3	27 ± 2	34 ± 3	31 ± 3
22 ч 00 мин вечера	50 ± 2	43 ± 4	51 ± 2	47 ± 4
Коэффициент достоверности (t)	5,00	3,60	4,72	3,20

логических факторов на токсичность изониазида при пероральном применении крысам. При введении препарата в вечерние часы токсичность его достоверно ниже, чем при введе-

нии в утреннее время. Установленный факт может быть использован при формировании рациональной программы химиотерапии туберкулеза с использованием изониазида.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гриценко Н.С., Долгих В.Т. Нарушение сократимости и метаболизма миокарда при длительном приеме изониазида. // Сибирский медицинский журнал. 2009; 5: 79-82.
2. Гуськова Т.А. Токсикология лекарственных средств. Москва: ИД «Русский врач»; 2003.
3. Лесная Н.А. Хронотоксикология некоторых алкилирующих агентов. Российский биотерапевтический журнал. 2003; 1: 30-31.
4. Лойт А.О., Савченков М.Ф. Профилактическая токсикология: руководство для токсикологов-экспериментаторов. Иркутск: Изд-во Иркут. ун-та; 1996.
5. Лоншакова К.С., Абгалдаева Е.А., Ажунова Т.А., Убашеев И.О., Разуваева Я.Г., Мондодоев А.Г. Нефропротективное действие фитозектракта «Нефрофит» при введении комплекса противотуберкулезных препаратов в эксперименте. Сибирский медицинский журнал. 2007; 1: 82-85.
6. Можкина Г.Н., Елистратова Н.А. Способ снижения нейротоксичности изониазида в эксперименте. Патент РФ, № 2574027; 2016.
7. О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных: приказ МЗ СССР от 12 августа 1977 г. № 755. Available at: URL: http://www.lawrussia.ru/texts/legal_822/doc822a409x272.htm.
8. Об утверждении правил лабораторной практики: приказ министерства здравоохранения и социального развития РФ от 23 августа 2010 г. № 708н. Available at: <http://www.old.soramn.ru/getres.php3?resid=15&reslocale=RU&resgroup=5>.
9. Павлюченкова Н.А., Крикова А.В., Мякишева Т.В., Сахаритова Е.А. Сравнительный анализ назначений противотуберкулезных препаратов в стационарах медицинских организаций гражданского и пенитенциарного секторов Смоленской области. Туберкулез и болезни легких. 2015; 5: 132-133.
10. Паролина Л.Е., Морозова Т.И., Отпущеникова О.Н., Разина А.Ю., Докторова Н.П. Клиническая эффективность лечения туберкулеза легких при множественной лекарственной устойчивости возбудителя. Туберкулез и болезни легких. 2015; 5: 138-139.
11. РД 64-126-91 «Правила доклинической оценки безопасности фармакологических средств (GLP)». Москва; 1991.
12. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. Москва: Гриф и К; 2012.
13. Трахтенберг И.М., Сова Р.Е., Шефтель В.О., Оникиенко Ф.А. Показатели нормы у лабораторных животных в токсикологическом эксперименте. Москва: Медицина; 1978.
14. Филиппова Г.Ф. Особенности временной организации суточных вариаций температуры тела лабораторных животных в эксперименте при применении производных ГОМК (оксибутират натрия). // Вестник Уральской медицинской академической науки. 2013; 2: 58-60.
15. Усов К.И., Юшков Г.Г., Гущина А.А., Гушин А.С. О нецелесообразности применения собак в качестве экспериментально-биологической модели при доклиническом исследовании комбинированных препаратов, содержащих изониазид. Лабораторные животные как основа экспериментальной медицины: Материалы научно-практической конференции, посвященной 25-летию создания службы экспериментального биомедицинского моделирования. 29 октября 2009 г. Томск, 2009; 104-106.
16. Фещенко Ю.И., Черенько С.А., Мальцев В.И., Викторов А.П., Матвеева Е.В., Логвина И.А. и др. Оценка значимости побочных реакций противотуберкулезных препаратов при лечении туберкулеза. // Украинский медицинский часопис. 2008; 3(65): 117-125.
17. Eyüboğlu T., Derinöz O. Rhabdomyolysis due to isoniazid poisoning resulting from the use of intramuscular pyridoxine. Turkish Journal of Pediatrics. 2013; 55: 328-330.

REFERENCES:

1. Gritsenko N.S., Dolgikh V.T. Infringement of contractility and a metabolism of a myocardium in long reception of isoniazid. Sibirskiy meditsinskiy zhurnal. 2009; 5: 79-82 (in Russian).
2. Gus'kova T.A. Toxicology of drugs. Moscow: ID «Russkiy vrach»; 2003 (in Russian).
3. Lesnaya N.A. Chronotoxicology of some alkylating agents. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal. 2003; 1: 30-31 (in Russian).
4. Loyt A.O., Savchenkov M.F. Preventive toxicology. Irkutsk; 1996 (in Russian).
5. Lonshakova K.S., Abgaldaeva E.A., Azhunova T.A., Ubashchev I.O., Razuvaeva Ya.G., Mondodoev A.G. Nephroprotective effect of phytoextract «Nephrophyt» of a complex of antituberculous preparations in experiment. Sibirskiy meditsinskiy zhurnal. 2007; 1: 82-85 (in Russian).
6. Mzhokina G.N., Elistratova N.A. A method for reducing the neurotoxicity of isoniazid in the experiment. Patent RF, № 2574027; 2016 (in Russian).
7. On measures on further improvement of the organizational forms of work with the use of experimental animals. Available at: http://www.lawrussia.ru/texts/legal_822/doc822a409x272.htm (accessed 28 February 2015) (in Russian).
8. Approval of the rules of good laboratory practice. Available at: <http://www.old.soramn.ru/getres.php3?resid=15&reslocale=RU&resgroup=5> (accessed 28 February 2015) (in Russian).
9. Pavlyuchenkova N.A., Krikova A.V., Myakishcheva T.V., Sakharitova E.A. Comparative analysis of tuberculosis drugs prescription in in-patient departments of civilian and penitentiary sectors of Smolensk region. Tuberkulez i bolezni legkikh. 2015; 5: 132-133 (in Russian).
10. Parolina L.E., Morozova T.I., Otpushchennikova O.N., Razina A.Yu., Doktorova N.P. Clinical efficiency of pulmonary tuberculosis treatment with multiple resistance of mycobacteria. Tuberkulez i bolezni legkikh. 2015; 5: 138-139 (in Russian).
11. RD 64-126-91. Terms of preclinical safety evaluation of pharmacological substances (GLP). Moscow; 1991 (in Russian).
12. Guidelines for pre-clinical trials of medicinal products. Part one. Moscow; 2012 (in Russian).
13. Trakhtenberg I.M., Sova R.E., Sheftel' V.O., Onikienko F.A. Performance standards in laboratory animals in toxicological experiment. Moscow; 1978 (in Russian).
14. Filippova G.F. Features of time regulations of laboratory animal bodies' temperature change in experiment with gammaoxybutanoic acid derivatives (sodium oxybutyrate). Vestnik Ural'skoy meditsinskoy akademicheskoy nauki. 2013; 2: 58-60 (in Russian).
15. Usov K.I., Yushkov G.G., Gushchina A.A., Gushchin A.S. On the inappropriate use of dogs as an experimental biological model for pre-clinical study of combined preparations containing isoniazid. In: Laboratory animals as the basis of experimental medicine: mat. Scient. Conf., dedicated to the 25th anniversary of the establishment of the pilot service for biomedical modeling. Tomsk; 2009 (in Russian).
16. Feshchenko Yu.I., Cheren'ko S.A., Mal'tsev V.I., Viktorov A.P., Matveeva E.V., Logvina I.A. et al. Significance evaluation of the antituberculous drugs side effects in tuberculosis treatment. Ukrain'skiy medichniy chasopis. 2008; 3(65): 117-125 (in Russian).
17. Eyüboğlu T., Derinöz O. Rhabdomyolysis due to isoniazid poisoning resulting from the use of intramuscular pyridoxine. Turkish Journal of Pediatrics. 2013; 55: 328-330.

K.I. Usov^{1,2}, T.A. Gus'kova³, G.G. Yushkov¹, A.V. Mashanov¹

INFLUENCE OF CHRONOBIOLOGICAL RHYTHMS ON TOXICITY OF ANTI-TUBERCULOSIS DRUG «ISONIAZID» UNDER EXPERIMENTAL CONDITIONS

¹Research Institute of Biophysics, Test Laboratory Center, Angarsk State Technical University, 665835, Angarsk, Russian Federation.

²Irkutsk State Medical University, Ministry of Health of Russia, 664003, Irkutsk, Russian Federation.

³Non-profit Partnership of Assistance to Health Care «Scientific Center of Quality Control», 115191, Moscow, Russian Federation.

The article reports results of experimental chronic toxicological investigations into the anti-tuberculosis preparation ISONIAZID permitting to prove toxicity lowering at its administration in the evening time.

Keywords: anti-tuberculosis preparation, isoniazid, chronobiology, chronobiological rhythms, good chemotherapy, experimental study.

Материал поступил в редакцию 09.03.2016 г.

УДК 615.21

НЕЙРОПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ НООПЕПТА НА МОДЕЛИ ФОКАЛЬНОГО ИШЕМИЧЕСКОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ СПИННОГО МОЗГА

В.Н. Ракитский, С.С. Пашин

ФБУН «Федеральный научный центр гигиены им. Ф.Ф. Эрисмана», Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 141014, Московская обл., г. Мытищи, Российская Федерация

Цель исследования – морфофункциональная оценка нейропротекторного действия ноопепта на экспериментальной модели фокального ишемического повреждения грудного отдела спинного мозга. Результатами патоморфологических и поведенческих исследований установлен нейропротекторный эффект ноопепта после фокального фотоиндуцированного тромбоза кровеносных сосудов грудного отдела спинного мозга крыс.

Ключевые слова: спинной мозг, нейроны, ишемия, фотохимическое повреждение, ноопепт.

Введение. Основными патогенетическими звеньями ишемического повреждения структур центральной нервной системы являются: гиперактивация рецепторов возбуждающих аминокислот (глутаматная нейротоксичность), накопление избыточного внутриклеточного кальция, активация перекисного окисления липидов. В последние годы получены доказательства эффективности ноопепта в отношении этих звеньев. Ноопепт снижал количество погибших нейронов в культурах клеток мозжечка, подвергшихся действию токсических доз глутамата [1], блокировал потенциал-зависимые кальциевые каналы изолированных нейронов [5], предотвращал выраженные нарушения перекисного окисления липидов, вызванные иммобилизационным стрессом [4]. Все это позволяет предполагать эффективность данного препарата для фармакологической коррекции ишемических повреждений спинного мозга.

Цель работы: морфофункциональная оценка нейропротекторного действия ноопепта на экспериментальной модели фокального ишемического повреждения грудного отдела спинного мозга.

Материалы и методы исследования. Работа выполнена на 200 крысах-самцах линии Вистар, массой 150 – 250 г в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспери-

ментальных животных» и Приказом Минздравсоцразвития России от 23.08.2010 г № 708н « Об утверждении правил лабораторной практики». Наркотизацию крыс осуществляли интраперитонеальным введением хлоралгидрата в дозе 350 мг/кг. Перед операцией наркотизированным крысам для адгезии эритроцитов к стенкам сосудов вводили в яремную вену 3% раствор красителя бенгальского розового (Sigma, США R 4507) в дозе 40 мг/кг. Крыс фиксировали в стереотаксической установке (Медикор, Россия). Кожу спины выбривали и обрабатывали 2% раствором йода. После срединного продольного разреза кожи отсепаровывали позвоночник. Для воспроизведения фотоиндуцированного тромбоза использовали оригинальную установку, состоящую из галогеновой лампы (24 В, 250 Вт) и отходящих от нее двух световодов диаметром 3 мм [2]. Световоды помещали над поверхностью грудного отдела позвоночника на расстоянии 1-2 мм. Длительность световой экспозиции составляла 30 мин. Для предупреждения термокоагуляционного эффекта поверхность позвоночника во время экспозиции постоянно орошали охлажденным изотоническим раствором. Затем рану обрабатывали и зашивали.

Животным контрольной группы производили операции по той же схеме, но краситель не вводили.

Ракитский Валерий Николаевич (Rakitskii Valerii Nikolaevich), д.м.н., профессор, академик РАН, и.о. директора ФБУН «Федеральный научный центр гигиены им. Ф.Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора, 141014, Московская обл., г. Мытищи, Российская Федерация, pestidci@yandex.ru

Пашин Сергей Сергеевич (Pashin Sergei Sergeevich), младший научный сотрудник отдела токсикологии и гигиены окружающей среды ФБУН «Федеральный научный центр гигиены им. Ф.Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора, 141014, Московская обл., г. Мытищи, Российская Федерация, ser46539381@yandex.ru

Ноопепт вводили внутривенно экспериментальной (опыт 2) группе животных (фотоиндуцированный тромбоз) в интервале между 1-ым и 9-ым днем после операции в дозе 0,5 мг/кг/день.

Для нейростологического исследования наркотизированных животных транскардиально перфузировали смесью формалин-спирт-уксусная кислота в пропорции 2:7:1. Спинной мозг извлекали через 4-5 час, фиксировали дополнительно в течение 1 часа и обезвоживали изопропанолом возрастающей концентрации [3]. Парафиновые срезы изготавливали по стандартной методике, депарафинировали и окрашивали крезильным фиолетовым прочным по методу Ниссля; люксолевым прочным синим и крезильным фиолетовым прочным по модифицированному методу Клювера-Баррера для выявления миелиновых волокон и клеток мозга. Для выявления ишемического поврежденных нейронов использовали ванадиевый кислый фуксин [6].

Для оценки моторных функций использовали разработанный нами метод нарушения произвольных, врожденных реакций (рефлексы сгибания, хватания, переворачивания, реакция постановки лапы на опору и др.).

Количественную оценку состояния и поведения животных проводили по интегральному показателю, критериями для которого служили несколько параметров состояния животных, регистрируемых в ходе исследований. Каждому критерию был присвоен определенный балл (табл. 1).

Результаты и обсуждение. Общая картина поведенческих реакций крыс после моделирования

фотоиндуцированного тромбоза с использованием ноопепта (опыт 2) была сходной с тем, что наблюдалось после аналогичного воздействия без использования нейропротектора (опыт 1). Однако выявленные у крыс патологические изменения носили менее выраженный характер, а восстановление функций происходило почти в два раза быстрее. В таблице 2 представлена динамика изменений поведения животных группы «опыт 2» в сравнении с группой «опыт 1» и контролем. Как следует из таблицы, на шестые сутки последствие приходился пик изменения поведенческих показателей в группе «опыт 2», но их количественная характеристика в среднем примерно в три раза выше, чем у животных группы «опыт 1», хотя можно констатировать лишь тенденцию к различию этого показателя (различия статистически недостоверны).

На 12-е сутки восстановительного периода повышение интегрального показателя у группы «опыт 2» становится статистически значимым по отношению к группе «опыт 1» и приближается к контролю. Спустя еще две недели данный показатель практически не отличается от контроля и фона.

Ноопепт уменьшал степень угашения моторных функций, снижал летальность. При этом ткань спинного мозга в очаге ишемического повреждения оставалась более сохранной, чем у контрольной группы животных (рис.1).

Анализ гистологических препаратов показал, что количество ацидофильных и гиперхромных нейронов в очаге ишемического повреждения и в перифокальной зоне достоверно меньше

Таблица 1

Шкала оценки поведенческих реакций у крыс по интегральному показателю в баллах

Критерии оценки	Балл
Отсутствие двигательной активности и рефлекса позы	0
Отсутствие двигательной активности и реакции на раздражитель задних конечностей и хвоста, но сохранение рефлекса позы	1
Двигательная активность только за счет передних конечностей, слабая реакция на раздражитель задних конечностей и хвоста	2
Имитация восстановления функций одной из задних конечностей	3
Имитация восстановления функций обеих конечностей	4
Восстановление функций задних конечностей, но сниженная реакция на тепловой раздражитель (более 8 сек)	5
Восстановление скорости реакции на тепловой раздражитель (8 сек и менее)	6

Таблица 2

Динамика изменений интегрального показателя поведенческих реакций крыс до (фон) и после операции по моделированию фотоиндуцированного тромбоза спинного мозга без использования (опыт 1) и с использованием (опыт 2) ноопепта (средние данные)

Группы животных	фон	Время после воздействия					
		1 сут.	6 сут.	12 сут.	24 сут.	48 сут.	68 сут.
Контроль	5,8±0,4	4,4±0,5	5,5±0,5	5,8±0,4	5,8±0,4	5,7±0,5	5,8±0,4
Опыт 1	5,6±0,5	4,1±0,6	0,8±0,6	1,7±0,5	2,9±0,6	4,2±0,9	5,0±0,7
Опыт 2	5,6±0,5	4,4±0,7	2,7±0,7	4,1±0,7*	5,1±0,7	5,5±0,5	5,7±0,5

Примечание: знаком «*» отмечены статистически значимые изменения ($p < 0,05$)

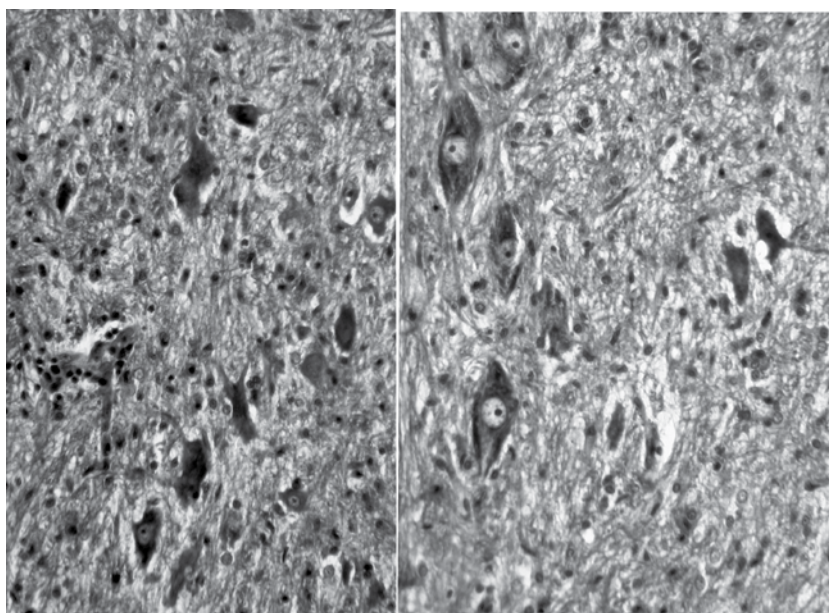


Рис. 1. Ишемическое повреждение нейронов (фотоиндуцированный тромбоз, фотоиндуцированный тромбоз + нейропротекторный эффект ноопепта). Окраска Люксолевым прочным синим с докрасиванием крезильовым фиолетовым прочным. Увеличение 20X

у животных, которым вводился нейропротектор. Полученные данные свидетельствуют о том, что ГВС-111 препятствует постишемическим деструктивным процессам в фокальном ишемическом очаге, индуцированном фототромбозом.

При этом наблюдается достаточно стабильная корреляция между нормализацией поведенческих реакций и сохранностью нейронов в зоне ишемического поражения (табл. 3).

Как следует из таблицы 3, на шестые сутки после экспозиции относительное количество неповрежденных нейронов перифокальной области

у животных, которым вводился нейропротектор, было значительно выше суммарного относительного количества нормальных и обратимо измененных нейронов у животных, не получавших нейропротектор.

Заключение. Результаты проведенных исследований не позволяют установить, на какие механизмы клеточной патологии влияет ноопепт, но обнаруженный нейропротекторный эффект препарата делает его перспективным для разработки методов коррекции постишемических нарушений в структурах спинного мозга

Количество клеток (в %) в перифокальной зоне с различной степенью повреждения после фотоиндуцированного тромбоза у крыс групп «опыт 1» (не вводился нейропротектор) и «опыт 2» (вводился нейропротектор)

Степень повреждения клеток	Группы животных	Сроки наблюдения после экспозиции		
		1 сут.	6 сут.	60 сут.
Без изменений	Опыт 1	84,2±3,3	11,8±1,3	30,0±1,8
	Опыт 2	87,2±2,8	44,1±3,1	72,9±3,0
Обратимые изменения	Опыт 1	8,1±1,7	22,5±1,6	28,7±1,7
	Опыт 2	8,4±1,6	37,3±2,8	15,1±1,9
Необратимые изменения	Опыт 1	7,7±2,5	65,7±1,4	41,3±3,0
	Опыт 2	5,2±2,0	18,6±2,8	12,0±1,8

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андреева Н.А., Стельмашук Е.В., Исаев Н.К., Островская Р.У., Гудашева Т.А., Викторов И.В. Нейропротективные эффекты ноотропного дипептида ГВС-111 при кислородно-глюкозной депривации, глутаматной токсичности и оксидативном стрессе in vitro. // Бюл. Эксперим. биол. и мед. - 2000.
2. Викторов И.В., Барсков И.В. Методика окрашивания ишемических

нейронов головного и спинного мозга. // Патол. физиол. и эксперим. терапия. - 1993. - № 2. - С. 53.
3. Викторов И.В., Пашин С.С. Применение изопропилового спирта в гистологических методах: обезвоживание и заливка ткани в парафин, обработка парафиновых срезов. Бюл. экспер. биол. мед., 2003, № 7, 119-120.
4. Лысенко А.В., Ускова

Н.И., Островская Р.У., Гудашева Т.А., Воронина Т.А. Дипептидный ноотроп ГВС-111 предотвращает накопление продуктов перекисного окисления липидов при иммобилизации. // Эксперим. и клин. фармакол. - 1997. - Т. 60. - № 5. - С. 15-18.
5. Solntseva E.I., Bukanova J., Ostrovskaya R. et al. The effects of piracetam and its novel peptide

analogue GVS-111 on neuronal voltage-gated calcium and potassium channels. // Gen. Pharmacol. - 1997. - V.29. - P. 85-89.
6. Victorov I.V., Prass K., Dirnagl U. Improved selective, simple, and contrast staining of acidophilic neurons with vanadium acid fuchsin. // Brain Res. Protocols. - 2000. - V. 5. - P. 135-139.

REFERENCES:

1. Andreeva N. A., Stelmashuk E. V., Isaev N. K., Ostrovskaya R. U., Gudashcheva T. A., Viktorov I. V. Neuroprotective effects of nootropic dipeptide GVS-111 in the conditions of oxygen-glucose deprivation, glutamate toxicity and oxidative stress in vitro. Bull. of Experim. Biol. and Med. 2000. (in Russian)
2. Viktorov I. V., Barskov I. V. Methodology for staining of ischemic

neurons of brain and spinal cord. Pathol. Physiol. and Experim. Therapy. 1993. №2, p. 53. (in Russian)
3. Viktorov I. V. & Pashin S. S. Application of isopropyl alcohol in histological methods: dehydration and embedment of tissues in paraffin, treatment of paraffin-embedded sections. Bull. of Exper. Biol., 2003, t. 136, №7, p. 119-120. (in Russian)

4. Lisenko A. V., Uskova N. I., Ostrovskaya, R. U., Gudashcheva T. A., Voronina T. A., Dipeptide nootropic agent GVS-111 prevents accumulation of products of lipid peroxidation during immobilization. Experim. and Clinic. Pharm. 1997. T. 60. № 5, p. 15-18. (in Russian)
5. Solntseva E.I., Bukanova J., Ostrovskaya R. et al. The effects

of piracetam and its novel peptide analogue GVS-111 on neuronal voltage-gated calcium and potassium channels. // Gen. Pharmacol. - 1997. - V.29. - P. 85-89.
6. Victorov I.V., Prass K., Dirnagl U. Improved selective, simple, and contrast staining of acidophilic neurons with vanadium acid fuchsin. // Brain Res. Protocols. - 2000. - V. 5. - P. 135-139.

V.N. Rakitskii, S. S. Pashin

NEUROPROTECTIVE EFFECT OF NOOPEPT SHOWN IN A MODEL OF FOCAL ISCHEMIC DAMAGE TO THE SPINAL CORD

F.F.Erisman Federal Scientific Center of Hygiene, Federal Service for Surveillance on. Consumer Rights Protection and Human Well-being, 141014, Mytishchi, Russian Federation

The aim of the study was a morphofunctional evaluation of the noopept neuroprotective effect in an experimental model of focal ischemic injury to the spinal cord thoracic segment. The results of the pathomorphological and behavioral studies proved the neuroprotective effect of noopept after focal photo-induced thrombosis in blood vessels of the spinal cord thoracic segment in rats.

Keywords: spinal cord, neurons, ischemia, photochemical damage, noopept.

Материал поступил в редакцию 23.12.2015 г.

ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ ТОКСИКОЛОГИЯ

УДК 581.1: 582.26

СОДЕРЖАНИЕ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПИГМЕНТОВ И РОСТ МИКРОВОДОРОСЛИ *PSEUDO-NITZSCHIA PUNGENS* (*VASCILLARIOPHYTA*) В ПРИСУТСТВИИ БИХРОМАТА КАЛИЯ

Ж.В. Маркина,
Н.А. Айздайчер

Институт биологии моря
им. А.В. Жирмунского
Дальневосточного отделения
Российской академии наук,
Владивосток, 690041,
г. Владивосток, Российская
Федерация

При наличии в среде бихромата калия в концентрациях 2, 4, 7 и 10 мг/л подавляло рост у диатомовой микроводоросли *Pseudo-nitzschia pungens* (штаммы PP-07 и PP-08) и приводило к снижению содержания хлорофилла *a* и каротиноидов. Все показатели уменьшались по сравнению с контрольными уже на первые сутки опыта, особенно при концентрациях 7 и 10 мг/л вещества. К четвертым суткам негативное действие токсиканта усиливалось. Через семь суток в присутствии 2 мг/л вещества численность клеток, содержание хлорофилла *a* и каротиноидов у обоих штаммов увеличивались, однако показатели не достигали контрольного уровня. Популяции исследованных штаммов микроводоросли оставались угнетенными при более высоких уровнях содержания бихромата калия. Штамм PP-07 оказался более чувствительным к веществу по сравнению с PP-08.

Ключевые слова: бихромат калия, загрязнение, одноклеточные водоросли, рост, фотосинтетические пигменты.

Введение. Растительные организмы в прибрежных акваториях пребывают в условиях все увеличивающегося поступления загрязняющих веществ, особенно тяжелых металлов. Один из наиболее токсичных их представителей – хром. Его соединение, бихромат калия, попадает в прибрежные акватории морей со сточными водами предприятий [1,2]. Учитывая первостепенную роль растений в экосистемах, как продуцентов кислорода, особенно важно изучение действия данного токсиканта на их физиологическое состояние. Хлорофилл *a* и каротиноиды – важнейшие показатели, дающие интегральную оценку состояния растительного организма. Известно, что хром вызы-

вает разрушение хлорофиллов *a* и *b*, изменение активности ферментов и подавление скорости фотосинтеза [1]. В связи с этим содержание фотосинтетических пигментов активно изучается при оценке действия бихромата калия, наряду с численностью клеток [3, 4]. Диатомовая микроводоросль *Pseudo-nitzschia pungens* привлекает внимание исследователей как продуцент нейротоксичной домоевой кислоты. Накапливаясь в тканях моллюсков-фильтраторов, кислота передается по пищевым цепям и вызывает отравление, даже гибель людей, а также теплокровных животных, что подтверждается многочисленными зарегистрированными фактами [5,6]. Проблема усугубляется тем, что

Маркина Жанна Васильевна (Markina Zhanna Vasil'evna), кандидат биологических наук, научный сотрудник Лаборатории физиологии Института биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук, 690041, г. Владивосток, Российская Федерация, zhanpav@mail.ru

Айздайчер Нина Александровна (Ayzdaycher Nina Aleksandrovna), кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Лаборатории физиологии Института биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук, 690041, г. Владивосток, Российская Федерация

«цветение» *P. pungens* в водах морей постоянно учащается [7,8].

Цель настоящей работы заключалась в оценке изменения роста, содержания хлорофилла *a* и каротиноидов у штаммов PP-07 и PP-08 микроводоросли *P. pungens* в присутствии бихромата калия.

Материалы и методы исследования. Объектом исследования служили штаммы микроводоросли *Pseudo-nitzschia pungens* (Grunow ex. P.T. Cleve) Hasle (Bacillariophyta) PP-07 и PP-08. Штамм PP-07 выделен из прибрежных вод зал. Восток (Японское море) в декабре 2007 года, штамм PP-08 выделен там же в сентябре 2008 г.

Лабораторные культуры выращивали на питательной среде *f* [9] при температуре $20 \pm 2^\circ\text{C}$ и освещении люминесцентными лампами со свето-темновым периодом 12 ч свет: 12 ч темнота, общей освещенностью $70 \text{ мкмоль/м}^2\text{с}$. Питательную среду готовили на основе стерилизованной морской воды соленостью 32%. В экспериментах исследовали действие соли шестивалентного хрома в виде бихромата калия в концентрациях 2, 4, 7 и 10 мг/л, который вносили в культуральную среду однократно в день постановки опыта.

Количество клеток водорослей подсчитывали под микроскопом Janamed 2 в счетной камере типа Ножотта объемом 0.044 мл. Скорость роста штаммов водорослей определяли по стандартной формуле: $v = (\ln N_2 - \ln N_1) / \Delta t$, где v – скорость роста, N_1 – численность клеток в культуре в момент времени t_1 , N_2 – численность клеток в культуре в момент времени t_2 , Δt – промежуток времени между t_1 и t_2 [9].

Содержание хлорофилла *a* и каротиноидов определяли стандартным методом экстракции из клеток ацетоном с последующим измерением на спектрофотометре Shimadzu-UV 2550. Расчет концентраций данных пигментов производили по стандартным формулам [10].

Образцы для подсчета численности клеток и определения содержания пигментов отбирали после тщательного перемешивания суспензии в одно и то же время спустя 2 ч после окончания темного периода на 1, 4 и 7 сут опыта. Продолжительность экспериментов – 7 сут. Все опыты проводили в трех повторностях. Эффективные и летальные концентрации вычисляли методом пробит-анализа [11]. На графиках представлены средние значения и стандартные отклонения.

Результаты и обсуждение. Внесение 2 мг/л бихромата калия не оказывало существенного влияния на численность клеток через сутки эксперимента; ингибирование возросло с увеличением содержания вещества в среде и продолжительностью экспозиции (рис. 1а).

К концу опыта популяция водоросли при содержании 2 мг/л токсиканта восстанавливалась, концентрации вещества 4–10 мг/л продолжали оказывать ингибирующий эффект на рост популяции. Скорость роста популяции данного штамма снижалась через сутки при добавлении бихромата калия во всех концентрациях (табл. 1). В последующие дни скорость роста в присутствии токсиканта увеличивалась, что связано с адаптацией водоросли к негативному фактору и ее восстановлением. В то время как контрольная популяция к этому времени находилась в стационарной фазе роста и темпы ее прироста замедлялись.

Уменьшение содержания хлорофилла *a* и каротиноидов у штамма PP-07 отмечено через сутки при всех уровнях содержания бихромата калия (рис. 1б, 1в). Так как изменение содержания хлорофилла *a* и каротиноидов носило сходный характер на всем протяжении опыта, мы будем обозначать их как фотосинтетические пигменты (ФП). К седьмым суткам содержание ФП возросло при 2 мг/л токсиканта. Более высокое количество вещества продолжало негативно сказываться на данных показателях.

Изменения динамики численности клеток и содержания ФП в токсической среде у штамма PP-08 носило иной характер. Число клеток достоверно не отличалось от контрольного при внесении 2 мг/л бихромата калия на первые сутки опыта, а концентрации токсиканта 4–10 мг/л приводили к ингибированию роста (рис. 2а). На четвертые сутки количество клеток сократилось при всех уровнях содержания токсиканта, однако изменения были менее выраженными, чем у штамма PP-07. С увеличением экспозиции до семи суток число клеток в присутствии 2 мг/л бихромата калия возрастало, в то время как при более высоких концентрациях продолжало снижаться. Скорость роста водоросли также изменялась в токсической среде (табл. 1). Содержание ФП через сутки опыта не отличалось от контрольного при внесении 2 мг/л токсиканта (рис. 2б, 2в), а при более высоких его концентрациях отмечено снижение данных показателей.

Штаммы *P. pungens* неодинаково реагировали на присутствие бихромата калия в среде: штамм PP-07 был более чувствителен к токсиканту, чем PP-08, что подтверждают также различные для обоих штаммов летальные и эффективные концентрации (табл. 2). Разный отклик на данное вещество описан ранее у трех штаммов вида *Scenedesmus obliquus* [2]. Вследствие того, что исследованные нами штаммы росли при одинаковых стандартных условиях, можно предположить, что нео-

Таблица 1

Скорость роста (делений/сутки) популяций штаммов PP-07 и PP-08 *Pseudo-nitzschia pungens* в присутствии бихромата калия (мг/л)

Продолжительность эксперимента, сутки	Концентрация бихромата калия (мг/л)				
	Контроль	2	4	7	10
Штамм PP-07					
1	0,27	0,15	-0,12	-0,31	-0,81
4	1,81	1,03	0,35	0,38	-0,48
7	0,20	0,76	0,29	0,34	0,44
Штамм PP-08					
1	0,01	0,04	-0,39	-0,75	0,02
4	0,58	0,20	0,12	0,28	-0,06
7	0,55	0,69	0,36	0,03	-0,23

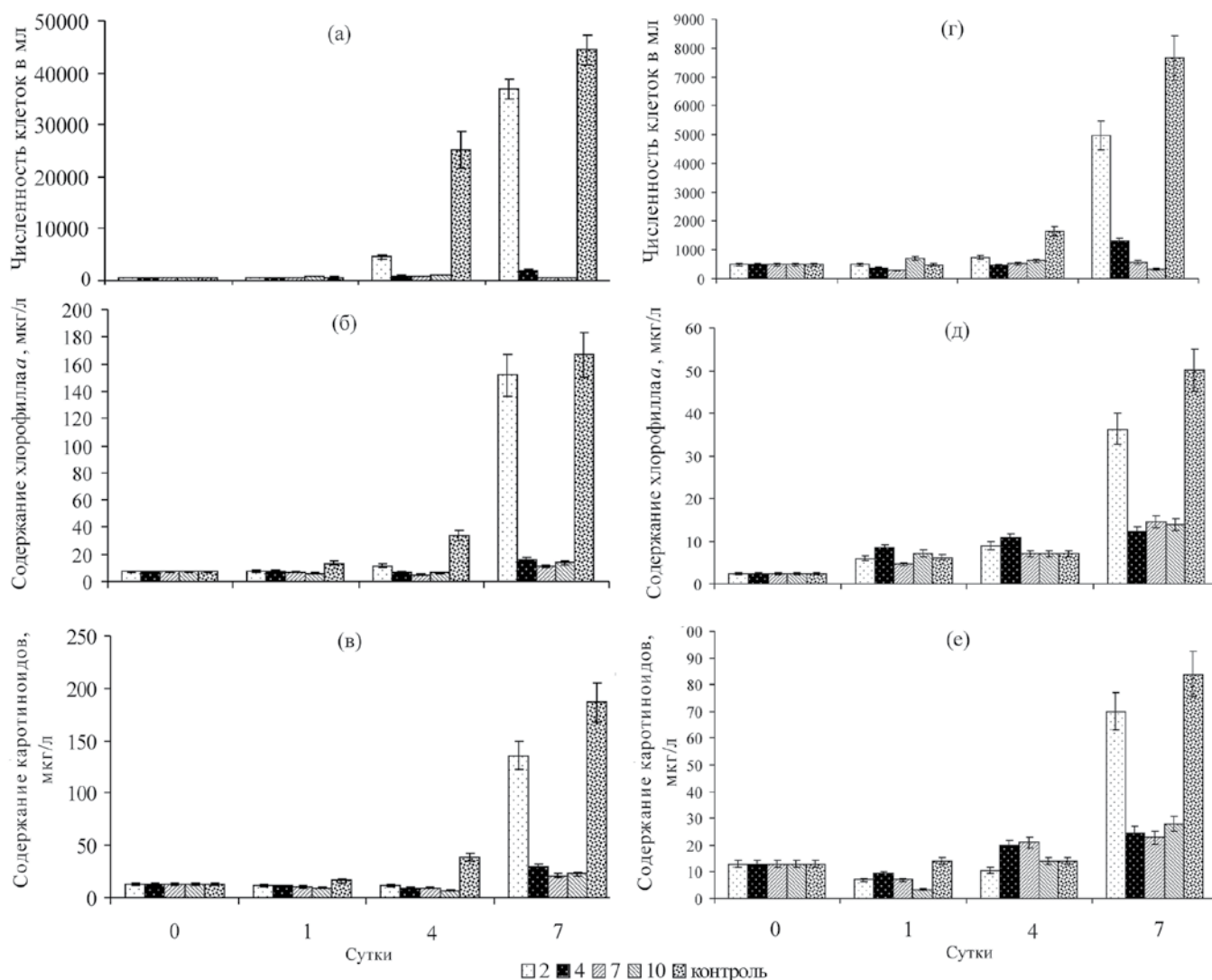


Рис. 1. Рост культуры (а), содержание хлорофилла (б) и каротиноидов (в) штамма PP-07 *Pseudo-nitzschia pungens*; рост культуры (г), содержание хлорофилла (д) и каротиноидов (е) штамма PP-08 *Pseudo-nitzschia pungens* в зависимости от содержания бихромата калия в среде.

ЛК₅₀²⁴ и ЭК₅₀²⁴ бихромата калия (мг/л) для штаммов PP-07 и PP-08 *Pseudo-nitzschia pungens*

Штамм <i>Pseudo-nitzschia pungens</i>	ЛК5024 и ЭК5024 бихромата калия (мг/л) для показателей жизнедеятельности <i>Pseudo-nitzschia pungens</i>		
	Численность клеток	Содержание хлорофилла а	Содержание каротиноидов
PP-07	7,3	7,8	8,2
PP-08	9,6	8,1	9,6

динаковый отклик водорослей обусловлен их физиолого-биохимическими особенностями.

Таким образом, бихромат калия во всех концентрациях оказывал негативное действие на содержание ФП, рост обоих штаммов *P. pungens* и на морфологию клеток.

Отмеченное в наших опытах при концентрациях 4–10 мг/л большее снижение числа клеток водоросли, чем уменьшение уровня ФП, по-видимому, связано с тем, что главная цель организма микроводоросли в неблагоприятных условиях – накопление фотосинтетических пигментов, особенно при отсутствии клеточного деления [12]. Такое явление описано ранее при воздействии бихромата калия на других представителях микроводорослей [3,4]. Негативное

действие хрома обусловлено, возможно, тем, что он, не являясь жизненно необходимым для растений, не имеет специального механизма детоксикации, что увеличивает токсическую нагрузку на клетку, приводя к нарушению процессов потребления минеральных веществ [1].

Заключение. Таким образом, бихромат калия во всех случаях оказал негативное действие на содержание ФП, а также рост штаммов PP-07 и PP-08 *P. pungens*. В целом, при 2 мг/л отмечено уменьшение числа клеток и содержания ФП, с последующим восстановлением культуры. При 4, 7 и 10 мг/л подавлялось деление клеток и снижалось содержание ФП на всем протяжении опыта. Штамм PP-07 *P. pungens* более чувствителен к токсиканту, чем PP-08.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Shanker A.K., Cervantes C., Loza-Tavera H., Avudainayagam S. Chromium toxicity in plants. *Envir. Int.* 2005; 31: 739–753.
- Přibyl P., Šepák V. Chromium influences growth and cell morphology but itself does not induce gametogenesis in three *Scenedesmus obliquus* strains. *Czech Phycol.* 2005; 5: 91–100.
- Новикова И.П., Паршикова Т.В., Власенко В.В. Изменение функционального состояния клеток *Chlamydomonas reinhardtii* Dang. в присутствии бихромата калия в среде. *Альгология.* 2008; 18: 113–122.
- Айздайчер Н.А., Маркина Ж.В. Влияние соли шестивалентного хрома на рост популяции, морфологию клеток и физиологические показатели бентосной микроводоросли *Attheya ussuriensis* Stonik, Orlova et Crawford, 2006 (Bacillariophyta) в культуре. *Биол. моря.* 2011; 37: 455–460.
- Villac M.C., Roelke D.L., Chavez F.P., Cifuentes L.A., Fryxell G.A. *Pseudo-nitzschia pungens*, *P. australis* Frenguelli and related species from the west coast of the U.S.A.: occurrence and domoic acid production // *J. Shellfish Res.* 1993; 12: 457–465.
- Trainer V.L., Wekell J.C., Horner R.A., Hatfield C.L., Stein J.E. Domoic acid production in *Pseudo-nitzschia pungens* // *Harmful Algae. Proceedings of the 8th International Conference on Harmful Algae,* 25–29 June 1997, Vigo Spain / Eds. Requera B., Blanco J., Fernandez M., Wyatt. Santiago de Compostela, Spain: Xunta de Galicia and IOC of UNESCO Publishers, 1998; 337–340.
- Hasle G.R. Are the most of the domoic acid-producing species of the diatom genus *Pseudo-nitzschia* cosmopolites? *Harmful Algae.* 2002; 1: 137–146.
- Stonik И.В., Орлова Т.Ю., Айздайчер Н.А. О морфологии диатомовых водорослей рода *Pseudo-nitzschia* из Дальневосточных морей России. *Вестн. РФФИ;* 2011; 1(69): 103–106.
- Guillard R.R.L. Ryther J.H. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt. and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Can. J. Microbiol.* 1962; 8: 229–239.
- Вода. Методика спектрофотометрического определения хлорофилла а. Гос. стандарт СССР. Гос. ном. СССР по охране природы. М.: Изд-во стандартов; 1990. 15 с.
- Руководство по определению методом биотестирования токсичности вод, донных отложений, загрязняющих веществ и буровых растворов. М.: РЭФИА, НИА – Природа; 2002.
- Брагинский Л.П., Величко И.М., Щербань Э.П. Пресноводный планктон в токсической среде. Киев: Наукова думка; 1987.
- Shanker A.K., Cervantes C., Loza-Tavera H., Avudainayagam S. Chromium toxicity in plants. *Envir. Int.* 2005; 31: 739–753.
- Přibyl P., Šepák V. Chromium influences growth and cell morphology but itself does not induce gametogenesis in three *Scenedesmus obliquus* strains. *Czech Phycol.* 2005; 5: 91–100.
- Novikova I.P., Parshikova T.V., Vlasenko V.V., Zubenko I.B. Change of functional state of *Chlamydomonas reinhardtii* Dang. Cells at the presence of K₂Cr₂O₇ in the environment. *Al'gologiya.* 2008; 18: 113–122 (in Russian).
- Ayzdaycher N.A., Markina Zh. Influence of changes in salinity of sea water on the growth, photosynthetic pigment content and cell size of the benthic alga *Attheya ussuriensis* Stonik, Orlova et Crawford, 2006 (Bacillariophyta). *Biologiya morya.* 2011; 6: 455–460 (in Russian).
- Trainer V.L., Wekell J.C., Horner R.A., Hatfield C.L., Stein J.E. Domoic acid production in *Pseudo-nitzschia pungens* // *Harmful Algae. Proceedings of the 8th International Conference on Harmful Algae,* 25–29 June 1997, Vigo Spain / Eds. Requera B., Blanco J., Fernandez M., Wyatt. Santiago de Compostela, Spain: Xunta de Galicia and IOC of UNESCO Publishers, 1998; 337–340.
- Villac M.C., Roelke D.L., Chavez F.P., Cifuentes L.A., Fryxell G.A. *Pseudo-nitzschia pungens*, *P. australis* Frenguelli and related species from the west coast of the U.S.A.: occurrence and domoic acid production // *J. Shellfish Res.* 1993; 12: 457–465.
- Trainer V.L., Wekell J.C., Horner R.A., Hatfield C.L., Stein J.E. Domoic acid production in *Pseudo-nitzschia pungens* // *Harmful Algae.* 2002; 1: 137–146.
- Stonik I.V., Orlova T.Yu., Ayzdaycher N.A. Morphology of diatom algae, genus *Pseudo-nitzschia* from Russian Far East seas. *Vestn. RFFI;* 2011; 1(69): 103–106 (In Russian).
- Guillard R.R.L. Ryther J.H. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt. and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Can. J. Microbiol.* 1962; 8: 229–239.
- State Standard 17.1.04.02–90. Water. Spectrophotometric determination of chlorophyll a. Moscow: Standartinform Publ., 1990 (In Russian).
- Manual on the determination of the toxicity of water, bottom sediments, pollutants and boring solutions. Moscow: REFA, NIA-Prroda 2002; (In Russian).
- Braginskiy L.P., Velichko I.M., Shcherban' E.P. Freshwater plankton in toxic environment. Kiev: Naukova dumka; 1987 (In Russian).

REFERENCES:

Zh.V. Markina, N.A. Ayzdaycher.

PHOTOSYNTHETIC PIGMENT CONTENT AND GROWTH OF MICROALGAE PSEUDONITZSCHIA PUNGENS (BACILLARIOPHYTA) IN THE PRSENCE OF POTASSIUM DICHROMATE

A.V. Zhirmunskii Institute of Marine Biology, Far East Branch of the Russian Academy of Sciences, 690041, Vladivostok, Russian Federation

Potassium dichromate concentrations of 2, 4, 7 and 10 mg/l inhibited the growth of marine diatom *Pseudonitzschia pungens* (PP-07 and PP-08 strains) and led to a reduced content of chlorophyll α and carotenoids. All parameters decreased as compared to the controls on the first experimental day, especially at 7 and 10 mg/l concentrations. By the fourth day the adverse effect intensified. After seven days in the presence of 2 mg/l of the substance, the content of chlorophyll α and carotenoids increased in both strains but the parameters did not attain the control level. The strains investigated of the microalgae populations remained inhibited at a more higher potassium dichromate content. PP-07 strain was more sensitive to the toxicant than PP-08 strain.

Keywords: potassium dichromate, pollution, unicellular algae, growth, photosynthetic pigments,

Переработанный материал поступил в редакцию 21.01.2016 г.

УДК 581.1; 582.232; 628.394

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ТОКСИЧНОСТЬ СОЛЕЙ И НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА ДЛЯ МИКРОВОДОРОСЛИ *SCENEDESMUS QUADRICAUDA*

В.И. Ипатова¹, А.Г. Дмитриева¹,
Т.В. Дрозденко²

¹Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова, 119991, г. Москва,
Российская Федерация

²ФГБОУ ВПО Псковский государственный
университет, 180000, г. Псков, Российская
Федерация

Исследовали влияние солей серебра (макроформа) и наночастиц серебра (нч Ag) в виде коллоида (наноформа) на микроводоросль *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Vreb. (=Desmodesmus communis (E. Hegew.) E. Hegew.). Основным показателем состояния культуры служило изменение численности клеток. По результатам хронических испытаний были рассчитаны величины ЛК₅₀ и пороговые концентрации МДК (ЛК₂₀) и на их основе индекс токсичности, показатель опасности и индекс опасности) исследованных веществ. Показано, что соединения серебра в макроформе более токсичны для популяции *S. quadricauda*, чем серебро в наноформе. По своему токсическому действию на изменение численности клеток *S. quadricauda*, по изменению величин ЛК₅₀, МДК и индексов токсичности и опасности в длительном эксперименте испытанные вещества можно расположить в следующем порядке: AgNO₃ > Ag₂SO₄ > нч Ag. Токсичность коллоидного серебра для культуры *Scenedesmus quadricauda* проявлялась в течение 20 суток после внесения препарата, а последующее восстановление численности клеток происходило за счет резистентных клеток в популяции.

Ключевые слова: *Scenedesmus quadricauda*, нитрат серебра, сульфат серебра, коллоидное серебро, наночастицы серебра, сравнительная токсичность.

Ипатова Валентина Ивановна (Ipatova Valentina Ivanovna), кандидат биологических наук, доцент, старший научный сотрудник по специальности гидробиология кафедры гидробиологии биологического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, г. Москва, Российская Федерация, viipatova@hotmail.com

Дмитриева Аида Георгиевна (Dmitrieva Aida Georgievna), кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник по специальности гидробиология кафедры гидробиологии биологического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, г. Москва, Российская Федерация, aigdai@mail.ru

Дрозденко Татьяна Викторовна (Drozdenko Tatiana Victorovna), кандидат биологических наук, доцент кафедры ботаники и экологии растений факультета естественных наук, медицинского и психологического образования ФГБОУ ВПО Псковского государственного университета, 180000, г. Псков, Российская Федерация tboichuk@mail.ru

Введение. В настоящее время в связи с широким использованием серебра в хозяйственной деятельности человека (пищевая промышленность, косметология, медицина, водоподготовка и т.п.) уделяется особое внимание исследованию механизмов и закономерностей биоцидного действия серебра в различных формах и, особенно, в виде солей и наночастиц.

Согласно данным стандартных токсикологических исследований серебро, относящееся к группе тяжелых металлов, может оказывать токсическое действие на организмы в малых дозах и со временем способно накапливаться в них [1,2]. Однако простые неорганические соли серебра (например, нитрат серебра) полностью диссоциируют в водном растворе, образуя свободные ионы серебра, активно взаимодействующие с живой клеткой. Существуют и иные формы серебра, мало распространенные в природных условиях (например, наносеребро) и их преобразования в условиях растворов не выявлено.

Противомикробное антисептическое действие серебра известно с давних времен. В присутствии белоксодержащих жидкостей бактерицидные свойства серебра резко снижаются, а в питательных бульонах для подавления развития клеток *Escherichia coli* (в количестве $n \cdot 10^6$) серебра требуется больше в 100 раз, чем в дистиллированной воде [3].

Наноматериалы могут обладать совершенно иными физико-химическими свойствами и биологическим (в том числе токсическим) действием, чем вещества в обычном физико-химическом состоянии. Токсичность наноматериалов тесно связана с их формой, размерностью, растворимостью, распределением частиц по размерам, площади поверхности, поверхностным и объемным свойствам, связыванием с белком [4].

Более подробно изучено влияние ионного серебра на водоросли. Бионакопление и токсичность Ag^+ из различных соединений серебра для морских и пресноводных водорослей были рассмотрены в обзоре Ratte [9]. Водоросли имеют высокий коэффициент бионакопления ионного серебра (более 104).

Механизм действия коллоидного серебра на растительную клетку недостаточно изучен. Показано, что многие наноматериалы индуцируют в клетках водорослей сильный окислительный стресс, нарушающий баланс между окислительными и антиоксидантными процессами [5,6]. Цитотоксический эффект наночастиц серебра (нч Ag), вызывающих окислительный стресс, может быть результатом взаимодействия ионов серебра с функциональными тиоловыми группами (-SH), поскольку ионы серебра имеют высокое сродство к ним [7]. В присутствии нч Ag может происходить увеличение уровня активных форм

кислорода, повреждающих белки и ДНК и вызывающих перекисное окисление липидов [8]. В зависимости от силы окислительного стресса клетки могут погибнуть в результате апоптоза или некроза.

В связи с разными физико-химическими свойствами солей серебра и серебра в виде коллоида требуется проведение сравнительных испытаний этих веществ на токсичность с использованием популяции микроводорослей в качестве тест-объекта в длительных экспериментах. Поскольку разные характеристики тест-объекта могут изменяться в течение воздействия токсиканта возникает необходимость разработки сравнительной количественной оценки длительного токсического воздействия. В связи с этим целью настоящей работы явилось исследование влияния солей серебра (макроформа) и серебра в виде коллоида (наноформа) и оценка сравнительной токсичности этих веществ для микроводоросли *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Breb. (= *Desmodesmus communis* (E. Hegew.) E. Hegew.).

Материалы и методы исследования. Объектом исследования была лабораторная альгологически чистая культура пресноводной хлорококковой микроводоросли *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Breb. (= *Desmodesmus communis* (E. Hegew.) E. Hegew.). Для экспериментов использовали нормально развивающуюся культуру в фазе логарифмического роста с исходной численностью 50-100 тыс кл/мл. Водоросли культивировали на среде Успенского № 1 в люминостате с интенсивностью света 3 клюкс при 12-часовом чередовании света и темноты, температуре 20-24°C и перемешивали 2 раза в сутки во избежание их оседания [10].

В качестве модельных токсикантов использовали серебро в форме раствора солей Ag_2SO_4 и $AgNO_3$ (макроформа), а также коллоидное серебро с размерами частиц 17-35 нм (нч Ag) без присадок марки Silver Max (наноформа) в концентрациях от 0,0001 до 0,1 мг/л. Концентрации солей серебра рассчитаны в расчете на ион серебра.

Испытания проводили в 3 повторностях для каждой концентрации и контроля в течение 30 суток.

Основным показателем состояния культуры служило изменение численности клеток (абсолютной и в % по отношению к контролю). Численность клеток подсчитывали с помощью светового микроскопа в камере Горяева. Контролем служил рост водорослей в чистой среде без добавления токсикантов.

По результатам хронических испытаний были рассчитаны LK_{50} (полуэффективная концентрация, вызывающая угнетение роста на 50%) и МДК (минимальная действующая концентрация LK_{20} , вызывающая угнетение роста на 20%)

и на их основе индекс токсичности (ИТ), показатель опасности (ПО) и индекс опасности (ИО) [11], позволяющие сравнивать между собой токсичность и относительную опасность различных токсикантов для микроводорослей, по следующим формулам:

$$\begin{aligned} \text{ИТ}(\text{AgNO}_3) &= \text{ЛК}_{50}(\text{AgNO}_3) / \text{ЛК}_{50}(\text{нч Ag}) \\ \text{ИТ}(\text{Ag}_2\text{SO}_4) &= \text{ЛК}_{50}(\text{Ag}_2\text{SO}_4) / \text{ЛК}_{50}(\text{нч Ag}) \\ \text{ПО}(\text{AgNO}_3) &= \text{ЛК}_{50}(\text{AgNO}_3) / \text{МДК}(\text{AgNO}_3) \\ \text{ПО}(\text{Ag}_2\text{SO}_4) &= \text{ЛК}_{50}(\text{Ag}_2\text{SO}_4) / \text{МДК}(\text{Ag}_2\text{SO}_4) \\ \text{ПО}(\text{нч Ag}) &= \text{ЛК}_{50}(\text{нч Ag}) / \text{МДК}(\text{нч Ag}) \\ \text{ИО}(\text{AgNO}_3) &= \text{ПО}(\text{AgNO}_3) / \text{ПО}(\text{нч Ag}) \\ \text{ИО}(\text{Ag}_2\text{SO}_4) &= \text{ПО}(\text{Ag}_2\text{SO}_4) / \text{ПО}(\text{нч Ag}) \end{aligned}$$

Чувствительность культуры к токсикантам оценивали по величине ЛК₅₀ и МДК за 3, 7, 21 и 30 суток. Статистическую обработку результатов проводили в программе Excel-2010 с использованием пакета анализа данных, для чего рассчитывали доверительный интервал и критерий Стьюдента при уровне значимости 0,05. Оценку токсического действия проводили на основании достоверности различий опытных значений численности клеток по сравнению с контролем.

Результаты и обсуждение. Эксперименты с использованием растворов солей сульфата и нитрата серебра, а также коллоидного серебра одинаковой концентрации были проведены в разные годы и сезоны. Концентрации солей серебра приведены в расчете на ион серебра.

Снижение общей численности клеток *S. quadricauda* (табл. 1) при воздействии Ag₂SO₄ наиболее существенным было при концентрации 0,1 мг/л: на 30 суток численность клеток составля-

ла всего 4% от контроля. При концентрациях 0,01 и 0,001 мг/л снижение численности клеток отмечено на 3 сутки с последующим увеличением ее на 21-30 сутки. Тенденция изменения численности клеток при концентрации 0,0001 мг/л сходна с таковой при 0,1 мг/л. Практически на все сроки наблюдений (за исключением 21 суток) численность клеток при 0,0001 мг/л была ниже, чем в контроле. Такой парадоксальный эффект низкой концентрации 0,0001 мг/л можно объяснить накоплением клетками серебра и слабым (или отсутствием) его выведением. При более высоких концентрациях (0,001 и 0,01 мг/л) серебро может выводиться из клеток в среду. Подобные эффекты были получены нами ранее при исследовании токсичности солей меди и хрома [12, 13].

Токсичность AgNO₃ (табл. 2) в концентрациях 0,1 и 0,01 мг/л проявлялась в течение всего эксперимента: на 30 суток при 0,01 мг/л численность клеток составляла 52% от контроля, а при 0,1 мг/л – всего 2,4%. Следует отметить, что при концентрации 0,001 мг/л достоверное снижение численности клеток отмечено на 3, 21 и 30 сутки. При концентрации 0,0001 мг/л численность клеток до 21 суток изменялась в пределах, близких к контролю, а на 30 сутки наблюдалось достоверное снижение численности клеток (76,3 % от контроля).

При концентрации 0,1 мг/л коллоидного серебра получен достоверный токсический эффект в период 3-21 сутки (табл. 3), который проявился в первую очередь в уменьшении жизнеспособности культуры, а на уровне популяции клеток во-

Таблица 1

Изменение общей численности клеток *Scenedesmus quadricauda* (в дес. тыс. кл/мл) в присутствии сульфата серебра

Время, сутки	Концентрация Ag ⁺ , мг/л				
	контроль	0.0001	0.001	0.01	0.1
3	<u>35.5 ± 1.2</u> 100 %	30.7 ± 1.2 87.0 %	25.3 ± 2.5 71.3 %	25.0 ± 4.0 70.8 %	17.0 ± 2.0 48.2 %
7	<u>58.0 ± 2.0</u> 100%	45.3 ± 2.1 78.1 %	<u>50.3 ± 6.7</u> 86.7 %	<u>62.0 ± 5.2</u> 106.9 %	24.7 ± 1.2 42.6 %
21	<u>112.3 ± 14.0</u> 100 %	<u>116.3 ± 13.2</u> 105.6 %	<u>140.0 ± 14.4</u> 124.7 %	<u>148.0 ± 2.8</u> 131.8 %	13.5 ± 3.5 12.0 %
30	<u>181.0 ± 21.6</u> 100 %	113.0 ± 7.81 62.3 %	<u>252.3 ± 15.7</u> 139.4 %	<u>279.0 ± 32.5</u> 154.1 %	7.3 ± 0.6 4.0 %

Примечание: в числителе дроби представлено количество клеток в дес. тыс. кл/мл; в знаменателе – в процентах по отношению к контролю. Жирным шрифтом выделены значения, достоверно меньшие контрольных.

Таблица 2

Изменение общей численности клеток *Scenedesmus quadricauda* (в дес. тыс. кл/мл) в присутствии нитрата серебра

Время, сутки	Концентрация Ag ⁺ , мг/л				
	контроль	0,0001	0,001	0,01	0,1
3	$\frac{36,0 \pm 3,0}{100\%}$	$\frac{44,3 \pm 2,1}{123,1\%}$	$\frac{25,0 \pm 3,6}{69,4\%}$	$\frac{15,7 \pm 0,6}{43,6\%}$	$\frac{10,7 \pm 1,2}{29,7\%}$
7	$\frac{76,3 \pm 2,1}{100\%}$	$\frac{69,3 \pm 4,9}{90,8\%}$	$\frac{82,0 \pm 3,0}{107,5\%}$	$\frac{44,7 \pm 4,6}{58,6\%}$	$\frac{6,0 \pm 1,0}{7,9\%}$
21	$\frac{199,7 \pm 11,9}{100\%}$	$\frac{198,3 \pm 17,6}{99,3\%}$	$\frac{172,0 \pm 10,4}{86,1\%}$	$\frac{150,7 \pm 8,1}{75,5\%}$	$\frac{8,3 \pm 0,6}{4,2\%}$
30	$\frac{252,7 \pm 16,2}{100\%}$	$\frac{192,7 \pm 3,1}{76,3\%}$	$\frac{126,3 \pm 7,5}{50,0\%}$	$\frac{131,3 \pm 4,2}{52,0\%}$	$\frac{6,0 \pm 1,0}{2,4\%}$

Примечание: в числителе дроби представлено количество клеток в дес. тыс. кл/мл; в знаменателе – в процентах по отношению к контролю. Жирным шрифтом выделены значения, достоверно меньшие контрольных.

Таблица 3

Изменение общей численности клеток *S. quadricauda* (в дес. тыс. кл/мл) в присутствии коллоидного серебра

Время, сутки	Концентрация коллоидного серебра, мг/л				
	контроль	0.0001	0.001	0.01	0.1
3	$\frac{16,0 \pm 0,92}{100\%}$	$\frac{17,2 \pm 1,8}{107,4\%}$	$\frac{15,5 \pm 0,57}{96,8\%}$	$\frac{15,8 \pm 0,65}{98,9\%}$	$\frac{6,3 \pm 0,6}{39,6\%}$
7	$\frac{51,7 \pm 1,73}{100\%}$	$\frac{61,3 \pm 2,85}{118,7\%}$	$\frac{61,2 \pm 4,25}{118,4\%}$	$\frac{64,3 \pm 3,46}{124,5\%}$	$\frac{7 \pm 3,92}{13,6\%}$
21	$\frac{340 \pm 33,95}{100\%}$	$\frac{388 \pm 29,03}{114,2\%}$	$\frac{440 \pm 16,97}{129,4\%}$	$\frac{386,7 \pm 27,91}{113,7\%}$	$\frac{16 \pm 11,32}{4,71\%}$
30	$\frac{566,7 \pm 32,7}{100\%}$	$\frac{613,3 \pm 80,3}{108,2\%}$	$\frac{496,7 \pm 3,3}{87,6\%}$	$\frac{436,7 \pm 17,3}{77,1\%}$	$\frac{207,7 \pm 188,9}{36,5\%}$

Примечание: в числителе дроби представлено количество клеток в дес. тыс. кл/мл; в знаменателе – в процентах по отношению к контролю. Жирным шрифтом выделены значения, достоверно меньшие контрольных.

дорослей – в массовой гибели чувствительных к серебру клеток, после которой в популяции оставались живые резистентные клетки, за счет которых в дальнейшем и происходило восстановление популяции. На 30 сутки наблюдалось увеличение численности клеток до 36,5% от контроля.

При концентрациях 0,01 и 0,0001 мг/л достоверное снижение численности происходило на 30 сутки, а при 0,0001 мг/л в течение всего периода наблюдений численность клеток была на уровне контроля.

Таким образом, наиболее выраженное токсическое действие солей серебра (макроформа) и коллоидного серебра (наноформа) по параметру

изменения численности выявлено при концентрации 0,1 мг/л. При этом наибольший токсический эффект получен при действии нитрата серебра, а наименьший – при действии коллоидного серебра.

Для более полной сравнительной оценки токсичности солей и частиц серебра нами впервые для растительного тест-объекта *Scenedesmus quadricauda* были использованы следующие показатели токсичности: индекс токсичности (ИТ), показатель опасности (ПО) и индекс опасности (ИО) на основе токсикометрических показателей ЛК₅₀ и МДК.

Сравнение величин ЛК₅₀ для всех 3 веществ (та-

бл. 4) показало, что LK_{50} со временем (с 3 по 30 сутки) в целом уменьшается. Величина LK_{50} коллоидного серебра максимальна на 3 сутки и, несмотря на последующее ее снижение, на 30 сутки она на порядок выше LK_{50} сульфата и нитрата серебра, что свидетельствует о меньшей токсичности нч Ag.

Величина МДК для Ag_2SO_4 и $AgNO_3$ снижалась к 30 суткам. При этом МДК для $AgNO_3$ была ниже, чем МДК Ag_2SO_4 и на 2 порядка ниже, чем нч Ag. МДК нч Ag была практически одинаковой в течение 21 суток, но к 30 суткам значение МДК повысилось, что указывает на снижение токсичности коллоидного серебра для тест-культуры..

По величинам LK_{50} сначала был рассчитан ИТ для двух сравниваемых попарно веществ (табл. 5). Оказалось, что наименьшим показателем ИТ был для пары $LK_{50} AgNO_3 / LK_{50} нч Ag$ (особенно на 3 и 30 сутки). Таким образом, чем меньше величина ИТ, тем более токсично вещество.

ПО рассчитан с учетом отношения величины LK_{50} к величине МДК для каждого вещества (табл. 6). Наиболее высоким ПО оказался для нитрата серебра (особенно на 3 и 30 сутки), что

указывает на его большую токсичность. По ПО на 30 сутки все исследованные вещества можно расположить в следующем порядке: $AgNO_3 > Ag_2SO_4 > нч Ag$. ИО, рассчитанный по отношениям $ПО Ag_2SO_4 / ПО нч Ag$ и $ПО AgNO_3 / ПО нч Ag$, подтверждает более высокий уровень опасности нитрата серебра по сравнению с сульфатом серебра по отношению к нч коллоидного серебра (табл. 6).

Проведенные исследования показали, что соединения серебра в макроформе более токсичны для лабораторной популяции *Scenedesmus quadricauda*, чем серебро в наноформе. Токсичность солей серебра проявлялась в течение 30 суток наблюдений, тогда как токсическое действие коллоидного серебра было эффективно в течение 3 недель для *Scenedesmus quadricauda* и 10 суток для *Monoglyphidium arcuatum* [14], после которых происходило постепенное восстановление численности клеток.

Колебательный характер величин изученных показателей токсичности (численности клеток, LK_{50} , МДК) исследованных веществ связан с активностью метаболических процессов в по-

Таблица 4

Изменение величин LK_{50} и МДК солей и наночастиц серебра в хроническом эксперименте

Сутки	$LK_{50} Ag_2SO_4$	$LK_{50} AgNO_3$	$LK_{50} нч Ag$	МДК Ag_2SO_4	МДК $AgNO_3$	МДК нч Ag
3	0,050	0,010	0,110	0,022	0,0002	0,024
7	0,006	0,005	0,048	0,001	0,0006	0,027
21	0,016	0,009	0,038	0,008	0,0020	0,024
30	0,005	0,001	0,047	0,001	0,0001	0,038

Таблица 5

Изменение величины индекса токсичности (ИТ) солей и наночастиц серебра в хроническом эксперименте

Сутки	$LK_{50} Ag_2SO_4 / LK_{50} нч Ag$	$LK_{50} AgNO_3 / LK_{50} нч Ag$
3	0,454	0,091
7	0,133	0,110
21	0,421	0,236
30	0,110	0,027

Таблица 6

Изменение величин показателя опасности (ПО) и индекса опасности (ИО) солей и наночастиц серебра в хроническом эксперименте

Сутки	ПО	ПО	ПО	ИО	ИО
	$\frac{ЛК_{50} Ag_2SO_4}{МДК Ag_2SO_4}$	$\frac{ЛК_{50} AgNO_3}{МДК AgNO_3}$	$\frac{ЛК_{50} нч Ag}{МДК нч Ag}$	$\frac{ПО Ag_2SO_4}{ПО нч Ag}$	$\frac{ПО AgNO_3}{ПО нч Ag}$
3	2,27	50,0	4,58	0,50	10,92
7	4,92	8,83	1,78	2,76	4,96
21	2,00	4,55	1,60	1,25	2,84
30	3,71	13,0	1,25	2,97	10,40

пуляциях микроводорослей, что обусловлено взаимодействием накопления серебра клетками и его выведения. Проведенные ранее эксперименты с бесклеточными фильтратами (после пребывания клеток водорослей в присутствии коллоидного серебра) [15] показали, что серебро активно накапливается клетками в первые 3 суток после внесения нч Ag. Поэтому после внесения в бесклеточные фильтраты интактных клеток их численность возрастала до уровня контроля. Это свидетельствует о том, что серебро содержалось в основном на или в клетках при первичной интоксикации, а не в среде. Одной из причин снижения токсичности серебра в процессе роста культуры может образованием металл-органических комплексов – основной формы соединений в биологических средах. Известно, что липиды, белки, пептиды, аминокислоты и их производные, полисахариды, карбоновые кислоты, флавины, фосфаты, нуклеотиды и др. соединения клетки содержат функциональные группы, способные присоединять металлы и выступают к качестве биомолекул-лигандов – адсорбентов металлов. Причем, ионы металлов связываются с биомолекулами в основном через серу, азот и кислород. Однако металлы могут существовать и в растворенном состоянии в виде ионов и низкомолекулярных соединений. Кроме того, при отравлении металлами (особенно при высокой концентрации в среде) клетки активно синтезируют металлсвязывающие цитоплазматические белки – фитохелатины, участвующие в детоксикации организма от избытка металлов, выполняя защитную функцию. Причем, эти соединения существуют короткое время и функционируют в момент интоксикации и еще некоторое время. Подобную функцию могут выполнять и низкомолекулярные белки, способные связывать металл.

Динамическая природа наночастиц затрудняет оценку при интоксикации. Однако использование индексов ИТ, ПО и ИО позволяет провести сравнительную оценку токсичности и опасности веществ в макро и микроформе.

Серебро в коллоиде, обладая большой общей поверхностью, оказывает сильное адсорбирующее действие и, по-видимому, более прочно связывается с различными биомолекулами с образованием крупных лигандов, удерживающих серебро. Поэтому токсичность нч Ag быстро снижается одновременно с уменьшением его альгицидного и бактерицидного действия. В связи с этим испытанный нами препарат коллоидного серебра марки Silver Max имеет ограниченный срок применения. Токсический эффект коллоидного наносеребра на популяцию клеток *Scenedesmus quadricauda* проявился в массовой гибели чувствительных к серебру клеток, после которой в популяции оставались живые резистентные клетки, за счет которых в дальнейшем и происходило восстановление популяции. Серебро, находящееся в составе солей, вследствие активного перемещения ионов серебра в клетку и обратно в среду оказывает длительный токсический эффект даже при низких концентрациях.

Выводы:

- По своему токсическому действию на изменение численности клеток *Scenedesmus quadricauda*, по изменению величин ЛК₅₀, МДК и индексов токсичности и опасности в длительном эксперименте все испытанные вещества можно расположить в следующем порядке: $AgNO_3 > Ag_2SO_4 > нч Ag$.

- Токсичность коллоидного серебра для культуры *Scenedesmus quadricauda* проявлялась в течение 20 суток после внесения препарата, а последующее восстановление численности клеток происходило за счет резистентных клеток в популяции.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Eister R. Silver hazards to fish, wildlife and invertebrates: a synoptic review. Biological Report. 1996; U.S. Department of the Interior. Washington DC.
2. Ratte H.T. Bioaccumulation and toxicity of silver compounds: a review. Environ. Toxicol. Chem. 1999; 18: 89-1
3. Mc Knight D.M., Morel M.M. Release of weak and strong copper-complexing agents by algae. Limnol. Oceanogr. 1979; 24: 823-
4. Alison C.P. Elder. Recent advances and challenges in nanotoxicology research. В кн.: Труды 4 съезда Токсикологов России. 6-8 ноября 2013 г. Москва. 20 Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. М.: Capital Press; 2013: 59-60.
5. Klaine S.J., Alvarez P.J.J., Batley G.E., Fernandes T.F., Handy R.D., Lyon D.Y., Mahendra S., McLaughlin M.J., Lead J.R. Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects. Environ. Toxicol. Chem. 2008; 27: 1825-51.
6. Hu X., Cook S., Wang P., Hwang H.M. In vitro evaluation of cytotoxicity of engineered metal oxide nanoparticles. Sci. Total Environ. 2009; 407: 3070-72.
7. Szivók I., Behra R., Sigg L. Metal-induced reactive oxygen species production in *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae). J. Phycol. 2009; 45: 427-35.
8. De Lima R., Seabra A.B., Durón N. Silver nanoparticles: a brief review of cytotoxicity and genotoxicity of chemically and biogenically synthesized nanoparticles. J. Appl. Toxicol. 2012; 2: 867-79.
9. Ratte H.T. Bioaccumulation and toxicity of silver compounds: a review. Environ. Sci. Technol. 1999; 18: 89-108.
10. Дмитриева А.Г., Артюхова В.И. Установление максимально допустимой концентрации для одноклеточных водорослей. В кн.: Филенко О.Ф., Соколова С.А., ред. Методические рекомендации по установлению эколого-рыбохозяйственных нормативов (ПДК и ОБУВ) загрязняющих веществ для воды водных объектов, имеющих рыбохозяйственное значение. М.: ВНИРО; 1998: 30-33.
11. Дулов А.С., Радиллов А.С., Глушкова А.В. Методические подходы к оценке сравнительной токсичности наночастиц и наноматериалов и продукции на их основе. В кн.: Труды 4 съезда Токсикологов России. 6-8 ноября 2013 г. Москва. 20 Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. М.: Capital Press; 2013: 185-188.
12. Дмитриева А.Г., Даллакян Г.А., Лысенко Н.Л. Анализ функциональных показателей популяции водорослей в условиях накопления меди. Альгология. 1992; 2(2): 30-33.
13. Дмитриева А.Г., Ипатова В.И., Кожанова О.Н., Дронина Н.Л., Желтухин Г.О., Крупина М.В. Реакция *Elodea canadensis* на загрязнение хромом среды обитания. Вестник МГУ. Сер. Биология. 2006; 2: 17-24.
14. Спиркина Н.Е., Ипатова В.И., Дмитриева А.Г. Оценка токсичности бесклеточных фильтратов микроводорослей после воздействия коллоидного серебра. В кн.: Труды V Всероссийской конференции по водной экотоксикологии с приглашением специалистов из стран ближнего зарубежья, посвященная памяти Б.А. Флерова «Антропогенное влияние на водные организмы и экосистемы». 28 октября - 1 ноября 2014 г. Борок. Борок; 2014: 41-3.
15. Ипатова В.И., Спиркина Н.Е., Дмитриева А.Г. Устойчивость микроводорослей к коллоидному наносеребру. Физиология растений. 2015; 62(2): 273-278.
16. Alison C.P. Elder. Recent advances and challenges in nanotoxicology research. In: Proc. 4th Russian Congress of Toxicology. Moscow, 2010. The Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare. М.: Capital Press; 2013: 59-60 (in Russian).
17. Klaine S.J., Alvarez P.J.J., Batley G.E., Fernandes T.F., Handy R.D., Lyon D.Y., Mahendra S., McLaughlin M.J., Lead J.R. Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects. Environ. Toxicol. Chem. 2008; 27: 1825-51.
18. Hu X., Cook S., Wang P., Hwang H.M. In vitro evaluation of cytotoxicity of engineered metal oxide nanoparticles. Sci. Total Environ. 2009; 407: 3070-72.
19. Szivók I., Behra R., Sigg L. Metal-induced reactive oxygen species production in *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae). J. Phycol. 2009; 45: 427-35.
20. De Lima R., Seabra A.B., Durón N. Silver nanoparticles: a brief review of cytotoxicity and genotoxicity of chemically and biogenically synthesized nanoparticles. J. Appl. Toxicol. 2012; 2: 867-79.
21. Ratte H.T. Bioaccumulation and toxicity of silver compounds: a review. Environ. Sci. Technol. 1999; 18: 89-108.
22. Дмитриева А.Г., Артюхова В.И. Установление максимально допустимой концентрации для одноклеточных водорослей. В кн.: Филенко О.Ф., Соколова С.А., ред. Методические рекомендации по установлению эколого-рыбохозяйственных нормативов (ПДК и ОБУВ) загрязняющих веществ для воды водных объектов, имеющих рыбохозяйственное значение. М.: ВНИРО; 1998: 30-33 (in Russian).
23. Дулов А.С., Радиллов А.С., Глушкова А.В. Методические подходы к оценке сравнительной токсичности наночастиц и наноматериалов и продуктов based on them. In: Proc. 4th Russian Congress of Toxicology. Moscow, 2010. The Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare. М.: Capital Press; 2013: 185-88 (in Russian).
24. Дмитриева А.Г., Даллакян Г.А., Лысенко Н.Л. Анализ функциональных параметров популяции водорослей в терминах накопления меди. Альгология. 1992; 2(2): 30-6 (in Russian).
25. Дмитриева А.Г., Ипатова В.И., Кожанова О.Н., Дронина Н.Л., Желтухин Г.О., Крупина М.В. Reaction *Elodea canadensis* to chromium pollution. Vestnik MGU. Ser. Biologiya. 2006; 2: 17-24 (in Russian).
26. Спиркина Н.Е., Ипатова В.И., Дмитриева А.Г. Evaluation of the toxicity of cell-free filtrate of algae after exposure to colloidal silver. In: Proc. Russian conference on water toxicology, inviting experts from neighboring countries, dedicated to the memory B.A. Flerov "Anthropogenic impact on aquatic organisms and ecosystems." 2014 Borok. Borok; 2014: 41-3 (in Russian).
27. Ипатова В.И., Спиркина Н.Е., Дмитриева А.Г. Resistance of Microalgae to Colloidal Silver Nanoparticles. Fiziologiya rasteniy. 2015; 62(2): 273-82 (in Russian).

V.I. Ipatova¹, A.G. Dmitrieva¹, T.V. Drozdenko²

COMPARATIVE TOXICITY OF SILVER SALTS AND SILVER NANOPARTICLES TO MICROALGA SCENEDESMUS QUADRICAUDA

¹ M.V. Lomonosov Moscow State University, 119991, Moscow, Russian Federation

² Pskov State University, 180000, Pskov, Russian Federation

The effect of silver salts (macroform) and colloidal silver nanoparticles (AgNP) (nanoform) on microalgae *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Breb. (= *Desmodesmus communis* (E. Hegew.) E. Hegew.) was studied. The change in the cells number was taken as the culture growth main indicator. Based on results of chronic tests, the magnitude of LC₅₀ and threshold limit values TLV (LC₂₀) were estimated and follow-up toxicity index, hazard index and hazard indicator of investigated substances were calculated. It was shown that silver salts in macro form are more toxic to the population of *S. quadricauda*, than nano form of silver. The tested substances can be ranged in the following order: AgNO₃ > Ag₂SO₄ > AgNP according to their toxic effects on the change in the *S. quadricauda* number of cells, LC₅₀ values, threshold concentrations (TLV) and calculated toxicity and hazard indexes in a long-term experiment. Toxicity of colloidal silver to *Scenedesmus quadricauda* occurred within 20 days after application of the preparation and the subsequent restoration of the cells number was due to the presence of resistant cells in the population.

Keywords: *Scenedesmus quadricauda*, silver nitrate, silver sulfate, colloidal silver, silver nanoparticles, comparative toxicity.

Переработанный материал поступил в редакцию 11.01.2016 г.

НОВЫЕ СВЕДЕНИЯ О ТОКСИЧНОСТИ И ОПАСНОСТИ ХИМИЧЕСКИХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ

УДК 615.9

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ДАННЫЕ ПО ИЗУЧЕНИЮ ТОКСИЧНОСТИ И ОПАСНОСТИ АЛЮМОСИЛИКАТНЫХ НАНОТРУБОК

*Н.М. Митрохин¹, М.И. Голубева¹,
И.Н. Разумная¹, С.А. Фастов²,
И.С. Фастов²*

¹АО «Всероссийский научный центр по безопасности биологически активных веществ» АО «ВНЦ БАВ», 142450, Московская область, г. Старая Купавна, Российская Федерация

²ЗАО «Нанотехнологии и инновации», 124482, г. Москва, Зеленоград, Российская Федерация

Алюмосиликатные нанотрубки рассматриваются как новый класс носителей биологически активных веществ. Исследование проведено в соответствии с действующими нормативно-методическими документами с целью экспериментальной оценки острой токсичности и опасности алюмосиликатных нанотрубок (каолин трубчатый обогащённый) при внутрижелудочном введении и нанесении на кожу мышей и крыс. В работе показано, что алюмосиликатные трубки (производство ЗАО «НТИИ», Россия) в соответствии с ГОСТ 12.1.007-76 могут быть отнесены к веществам 4 класса опасности (вещества малоопасные). На основании результатов исследования можно полагать, что получен перспективный наноразмерный материал, который может быть использован в качестве носителя лекарственных средств

Ключевые слова: алюмосиликатные нанотрубки (каолин трубчатый обогащённый), острая токсичность и опасность, внутрижелудочное введение, нанесение на кожу, мыши, крысы.

Введение. Изучение биологических эффектов наночастиц и наноматериалов является актуальной проблемой. Известно, что наночастицы могут проникать в организм через различные барьеры, в том числе через кожу, слизистую дыхательных путей, желудочно-кишечный тракт. Токсическое действие наночастиц определяется не только их массой, но также их размерами и формой [1,2].

Алюмосиликатные нанотрубки (АНТ) (каолин трубчатый обогащённый) могут рассматриваться как новый класс наноносителей биологически активных веществ для использования в медицине при создании новых лекарственных форм препаратов.

АНТ имеют многослойную трубчатую структуру, характеристика которой схематично представлена на рисунке 1. АНТ обладают внутрен-

ней полостью, в связи с чем находят применение в качестве контейнеров для адресной доставки лекарственных средств (ЛС) и обеспечения их пролонгированного действия [3-7]. АНТ характеризуются химической стабильностью, механической прочностью и высокой сорбционной способностью, что дает возможность помещать ЛС внутрь полости [5-8]. АНТ могут быть получены как из природных источников, так и путём химического синтеза [5]. В работе [9] показано, что АНТ обладают низкой цитотоксичностью, что подтверждает перспективность их использования в медицинских целях.

Настоящее исследование проведено с целью экспериментальной оценки острой токсичности и опасности АНТ на мышах и крысах при внутрижелудочном (в/ж) введении и нанесении на кожу.

Митрохин Николай Михайлович (Mitrokhin Nikolay Mihailovich), доктор биологических наук, профессор, генеральный директор АО «ВНЦ БАВ», 142450, Московская обл. г. Старая Купавна, Российская Федерация

Голубева Маргарита Ивановна (Golubeva Margarita Ivanovna), кандидат биологических наук, завед. лаб. профилактической токсикологии и гигиены АО «ВНЦ БАВ», 142450, Московская обл., г. Старая Купавна, Российская Федерация, vnc@pc-club.ru,

Разумная Ирина Николаевна (Razumnaya Irina Nikolaevna) АО «ВНЦ БАВ», 142450, Московская обл. г. Старая Купавна, Российская Федерация

Фастов Сергей Анатольевич (Fastow Sergey Anatoljevich) ЗАО «Нанотехнологии и инновации», 124482, г. Москва, Зеленоград, Российская Федерация

Фастов Илья Сергеевич (Fastow Ilya Sergeevich) ЗАО «Нанотехнологии и инновации», 124482, г. Москва, Зеленоград, Российская Федерация



Рис. 1. Схематичное изображение многослойной трубчатой структуры алюмосиликатных нанотрубок.

Материалы и методы исследования. АНТ произведены компанией ЗАО «Нанотехнологии и инновации» из природного каолина по ТУ 57 2920-001-17527415-12. Порошкообразный материал АНТ в основном представлен трубчатой фракцией (не менее 80%). Измерение размеров АНТ проведено при помощи атомно-силового микроскопа «Solver Pro, NT-MDT» и просвечивающей электронной микроскопии на Hitachi H-500 (рис. 2).

Внешний диаметр АНТ составляет 90-140 нм, внутренний диаметр – 10-60 нм, длина – 300-2000 нм. Удельная поверхность использованных нанотрубок составляет 62.4 м²/г, удельный вес 2.55 г / см³. Химический состав алюмосиликатных нанотрубок: Al₂O₃ · 2SiO₂ · 4H₂O.

Экспериментальные исследования проводили в соответствии с действующими нормативно-методическими документами и Приказом Минздравсоцразвития России от 23.08.2010 г № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики». Эксперименты проводились в весенний период. Животных, полученных из питомника РАМН, прошедших карантин в течение 10 дней, содержали в однотипных условиях вивария на стандартном пищевом рационе. В экспериментах использовали нелинейных белых мышей самцов и самок массой тела 18-24 г, нелинейных белых крыс самцов и самок массой тела 180-240 г. Группы формировались методом случайных чисел с использованием массы тела в качестве ведущего признака. Каждая подопытная и контрольная группа состояла из 10 особей.

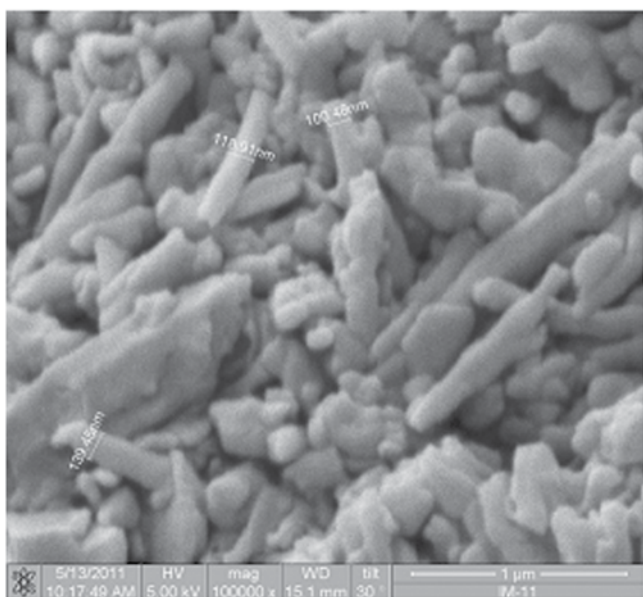
Проведено изучение острой токсичности АНТ при в/ж введении крысам и мышам в виде суспензии в 1% крахмальном геле в максимально допустимых объемах и нанесении на кожу крысам

в виде мази на вазелиновой основе (при экспозиции 4 часа), мышам «пробирочным методом» при погружении хвостов на 2/3 их длины в 25 %-ную взвесь препарата в 1 % крахмальном геле (на 2 ч). Период наблюдения за животными после однократного введения препарата составил 14 дней.

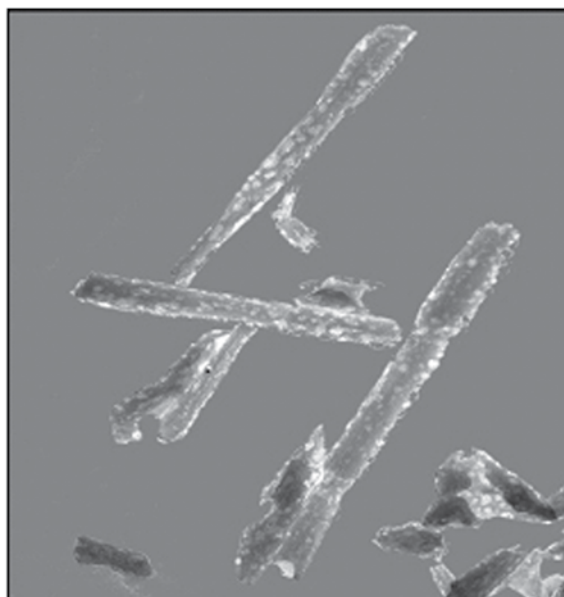
Общее состояние подопытных животных определяли по внешнему виду, поведенческим реакциям, клинической картине интоксикации, пищевой активности, динамике массы тела (еженедельно). Критерием острой токсичности служили изменения этих показателей и возможная гибель подопытных животных. Кроме того, оценивали признаки возможного местного раздражающего действия АНТ. По завершении эксперимента подопытных крыс подвергали эвтаназии, вскрывали, оценивали макроскопическую картину, определяли относительную массу органов (печень, сердце, селезенка, почки, надпочечники, щитовидная железа, тимус, у самок – яичники, матку, у самцов – семенники). Класс опасности вещества при в/ж и кожном путях поступления определяли в соответствии с классификацией ГОСТ 12.1.007-76.

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с использованием критерия t Стьюдента. Разницу между контролем и опытом считали достоверной при P≤0,05.

Результаты и обсуждение. *Определение острой токсичности АНТ при в/ж введении крысам.* В/ж крысам самцам и самкам АНТ вводили в диапазоне доз от 5000 до 20000 мг/кг. АНТ в дозах 15000 и 20000 мг/кг вводили дробно в два приема с интервалом в два часа, введение в больших дозах технически не представляется возможным. Признаков токсического отравления, а также гибели при введении испытанных доз



а.



б.

Рис. 2. а. Изображения алюмосиликатных нанотрубок, полученные на РЭМ «Quanta 200 3D»
б. Изображения алюмосиликатных нанотрубок, полученные на АСМ «Solver Pro, NT-MDT»
и на РЭМ Hitachi H-500.

не отмечали. Динамика массы тела подопытных крыс самцов и самок не отличалась от контрольных групп.

При макроскопическом исследовании внутренних органов подопытных и контрольных животных во время вскрытия в конце эксперимента каких-либо особенностей не выявлено. Органы расположены правильно, свободная жидкость в грудной и брюшной полостях отсутствует. Определение относительной массы внутренних органов контрольных и подопытных крыс (самцов и самок), получавших АНТ в максимальной дозе 20000 мг/кг, не выявило достоверных отклонений от контроля.

Таким образом, величина DL_{50} АНТ при в/ж введении крысам самцам и самкам составила более 20000 мг/кг.

Определение острой токсичности АНТ при в/ж введении мышам. В/ж мышам самцам и самкам АНТ вводили в диапазоне доз от 5000 до 20000 мг/кг. Доза 20000 мг/кг технически является максимально вводимой. После введения АНТ в дозах 10000, 15000 и 20000 мг/кг через 2-3 минуты у животных отмечали снижение двигательной активности, которое сохранялось в течение 1-1,5 часов, после чего состояние животных нормализовалось. У контрольных мышшей, которым в/ж вводили 1% крахмальный гель, не отмечали изменений в поведении.

В дальнейшем в течение всего периода наблюдения (14 дней) подопытные животные по поведению, двигательной и пищевой активности, дина-

мике массы тела не отличались от контрольных. Гибели мышшей при введении испытанных доз не отмечали.

Определение острой токсичности АНТ при накожном нанесении крысам. На крысах острую токсичность АНТ изучали при эпидермальных аппликациях на эпилированную кожу в виде вазелиновой мази в концентрациях 25 %, 50 %, и 65 %, что соответствует дозам 1250 мг/кг (15 мг/см²), 2500 мг/кг (30 мг/см²) и 3250 мг/кг (40 мг/см²). Нанесение вещества в больших концентрациях технически не представляется возможным. Признаков токсического отравления, гибели животных, а также местного раздражающего действия вещества при аппликации в испытанных концентрациях не наблюдали. Динамика массы тела крыс при однократном нанесении на кожу мази АНТ не отличалась от контроля.

При макроскопическом исследовании внутренних органов во время вскрытия в конце эксперимента каких-либо особенностей не выявлено. Органы расположены правильно, свободная жидкость в грудной и брюшной полостях отсутствует. Определение относительной массы внутренних органов контрольных и подопытных крыс (самцов и самок), подвергавшихся воздействию АНТ в максимальной дозе 3250 мг/кг (40 мг/см²), не выявило достоверных отклонений от контроля.

Определение острой токсичности АНТ при накожном нанесении мышам. Клинических признаков интоксикации и гибели мышшей самцов и самок при хвостовой аппликации 25 % взвеси

алюмосиликатных нанотрубок в 1 % крахмальном геле не наблюдали. Динамика массы тела мышцей не отличалась от контроля.

Заключение. Изучена острая токсичность препарата АНТ (каолин трубчатый обогащенный) производства ЗАО «НТИИ», Россия, при однократном в/ж введении и нанесении на кожу нелинейных крыс обоего пола и нелинейных мышцей обоего пола. DL_{50} АНТ для крыс обоего пола и мышцей обоего пола при в/ж поступлении составила более 20000 мг/кг. DL_{50} АНТ для крыс

обоего пола и мышцей обоего пола при нанесении на кожу составила более 3250 мг/кг (40 мг/см²).

Проведенные исследования позволяют сделать вывод о том, что при в/ж введении и нанесении на кожу лабораторным грызунам (крысы обоего пола и мышцей обоего пола) АНТ (каолин трубчатый обогащенный) производства ЗАО «НТИИ», Россия в соответствии с ГОСТ 12.1.007-76 по уровню средних смертельных доз (DL_{50}) может быть отнесен к веществам 4 класса опасности (вещества малоопасные).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Хамидулина Х.Х., Давыдова Ю.О. Международные подходы к оценке токсичности и опасности наночастиц и наноматериалов. // Токсикологический вестник. - 57-53 -6№ -2011.
2. Elder, E.C.P. The Toxicology of Nanomaterials. - Univ. Rochester, .2007 37 - p.
3. M. Ebbesen, T. G. Jensen. Nanomedicine: techniques, potentials, and ethical implications. J. Biomed. Biotech., 2006) 11-1 (1).
4. S. Y. Madani, N. Naderi, O. Dissanayake, A. Tan, A. M. Seifalian. A new era of cancer treatment: carbon

- nanotubes as drug delivery tools, Int. J. Nanomedicine., 2011) 2979-2963 (6).
5. Крылов И.Б., Терентьев А.О., Фастов С.А. Анализ состава и геометрических параметров алюмосиликатных нанотрубок. В кн.: Сборник материалов III Всероссийской молодежной конференции с элементами научной школы «Функциональные наноматериалы и высокочистые вещества». М.; 2012: - С. 39-37.
6. Арзуманян А.В., Фирстова В.В., Герасимов В.Н., Терентьев А.О., Фастов С.А. Анализ иммунобиологических свойств алюмосиликатных

- nanotubes // Сборник материалов III Всероссийской молодежной конференции с элементами научной школы «Функциональные наноматериалы и высокочистые вещества». М.; 2012: - С. 39-37.
7. Y.M. Lvov and R.R. Price, Halloysite nanotubes: a novel substrate for the controlled delivery of bioactive molecules, in Bio-Inorganic Hybrid Nanomaterials. Wiley, chap. 14, p. 454 (2008).
8. Elshad Abdullayev, Yuri Lvov, Halloysite Clay Nanotubes as Ceramic «Skeleton» for Functional Biopolymer

- Composites with Sustained Drug Release, Journal of Materials Chemistry B, 2903-2894, 1, 2013, DOI: 10.1039/C3TB20059K, Feature Article.
9. Sergey A. Fastov, Alexey O. Terent'ev, Ilija S. Fastov, Victoria V. Firstova, Olga V. Kalmantaeva. Study of halloysite clay nanotube toxicity as related to their structure // 245st ACS National Meeting & Exposition, New Orleans, LA. April //2013 ,11-7 277 PMSE/POLY Poster Session, веб публикация: http://abstracts.acs.org/chem/245nm/program/view.php?obj_id=185265&terms=

REFERENCES:

1. Khamidulina Kh.Kh., Davydova Yu.O. International approaches to assessment toxicity and hazard nanoparticles and nanomaterials. // Toksikologicheskij vestnik, 2011.- №6.- P. 53-57. (in Russian)
2. Elder, E.C.P. The Toxicology of Nanomaterials. - Univ. Rochester, 2007. - 37 p.
3. M. Ebbesen, T. G. Jensen. Nanomedicine: techniques, potentials, and ethical implications. J. Biomed. Biotech., 1, 1-11 (2006).
4. S. Y. Madani, N. Naderi, O. Dissanayake, A. Tan, A. M. Seifalian. A new era of cancer treatment: carbon

- nanotubes as drug delivery tools, Int. J. Nanomedicine., 6, 2963-2979 (2011).
5. Krylov I.B., Terent'ev A.O., Fastov S.A. Analysis of the composition and geometrical parameters aluminosilicate nanotubes. In the book.: Collection of III All-Russian Youth Conference with elements of scientific school "Functional nanomaterials and high-purity substances", M.; 2012:- P. 353-355. (in Russian)
6. Arzumanyan A.V., Firstova V.V., Gerasimov V.N., Terent'ev A.O., Fastov S.A. Analysis immunobiological

- properties of aluminosilicate nanotubes. In the book.: Collection of III All-Russian Youth Conference with elements of scientific school "Functional nanomaterials and high-purity substances", M.; 2012: 37-39. (in Russian)
7. Y.M. Lvov and R.R. Price, Halloysite nanotubes: a novel substrate for the controlled delivery of bioactive molecules, in Bio-Inorganic Hybrid Nanomaterials. Wiley, chap. 14, p. 454 (2008).
8. Elshad Abdullayev, Yuri Lvov, Halloysite Clay Nanotubes as Ceramic «Skeleton» for Functional

- Biopolymer Composites with Sustained Drug Release, Journal of Materials Chemistry B, 2013, 1, 2894-2903, DOI: 10.1039/C3TB20059K, Feature Article.
9. Sergey A. Fastov, Alexey O. Terent'ev, Ilija S. Fastov, Victoria V. Firstova, Olga V. Kalmantaeva. Study of halloysite clay nanotube toxicity as related to their structure//245st ACS National Meeting & Exposition, New Orleans, LA. April 7-11, 2013// 277 PMSE/POLY Poster Session, web-publishing: http://abstracts.acs.org/chem/245nm/program/view.php?obj_id=185265&terms=

N.M. Mitrokhin¹, M.I. Golubeva¹, I.N. Razumnaya¹, S.A. Fastov², I.S. Fastov²

EXPERIMENTAL DATA ON INVESTIGATION INTO TOXICITY AND HAZARD OF ALUMINOSILICATE NANOTUBES

¹ Joint-stock Company «National Research Center for Biologically Active Compounds», 142450, Staraya Kupavna, Moscow region, Russian Federation

² Closed Joint-Stock Company «Nanotechnologies & Innovations» (JSC N&T), 124482 Zelenograd, Moscow, Russian Federation

Aluminosilicate clay nanotubes (ANT, halloysite clay) are considered as a new class of carriers for biologically active substances. The study was conducted in accordance with regulatory guidance documents in force for the purpose of experimental evaluation of acute toxicity and hazard of ANT intragastrically administrated and applied to the skin in mice and rats. It is shown that the tubular enriched kaolin (aluminosilicate clay nanotubes) (production of °С «NT&I», Russia) in accordance with GOST 12.1.007-76 may be referred to hazard class 4 (low hazard substance). Based on the results of the study, it could be said that a promising nano-sized material (ANT) was produced that can be used as a drug carrier for medications.

Keywords: Aluminosilicate clay nanotubes (halloysite clay), acute toxicity and hazard, intra gastric administration, application to skin, mice, rats.

Материал поступил в редакцию 26.01.2016 г.

«СЪЕЗДЫ И КОНФЕРЕНЦИИ»

ОБ УЧАСТИИ В 54-М СОВМЕСТНОМ ЗАСЕДАНИИ КОМИТЕТА ОЭСР ПО ХИМИИ И РАБОЧЕЙ ГРУППЫ ОЭСР ПО ХИМИИ, ПЕСТИЦИДАМ И БИОТЕХНОЛОГИИ



(г. Париж, Франция, 09.02.2016 – 11.02.2016)

9 – 11 февраля 2016 года в Париже состоялось 54-е совместное заседание Комитета ОЭСР по химии и Рабочей группы по химическим веществам, пестицидам и биотехнологиям (далее – Комитет) Организации экономического сотрудничества и развития (далее – ОЭСР).

В заседании Комитета приняли участие представители государств-членов ОЭСР, государств и международных организаций-наблюдателей. В состав делегации Российской Федерации были включены представители Роспотребнадзора, Минпромторга России, Минэкономразвития России, Росстандарта, Росатома, эксперты НИИ ЭЧ и ГОС им. А.Н. Сысина Минздрава России, НИУ ВШЭ.

Многие вопросы, рассматриваемые на данном заседании, носят стратегический характер. Ключевыми вопросами повестки дня заседания Комитета были следующие:

1. Рассмотрение возможностей взаимодействия Комитета по химии с рабочей группой по безопасности потребительской продукции.

Страны-члены ОЭСР уделяют огромное внимание оценке риска и управлению им на всех стадиях «жизненного» цикла продукта. Оценка риска включает такие этапы, как разработка и утверждение стандартов безопасности; дорыночный контроль; пограничный и таможенный контроль; контроль и надзор обращения на рынке.

В рамках данного направления деятельности российской делегацией выражена заинтересованность в совместной деятельности. Российской Федерацией было предложено объединить усилия двух рабочих групп и выбрать ряд видов продукции, которые формируют высокие уровни химических рисков для потребителей (например, изделия бытовой химии, ряд отделочных материалов), и выполнить проект по оценке рисков и выработке общих и част-

ных мер по их минимизации. Рабочая группа приняла во внимание все комментарии и предложения для разработки плана их дальнейшей деятельности.

2. Обмен информацией по наилучшим доступным технологиям.

Во многих странах использование наилучших доступных технологий (НДТ) или аналогичных концепций играет ключевую роль в определении условий выдачи разрешений для промышленных выбросов. НДТ – «технология производства продукции (товаров), выполнения работ, оказания услуг, определяемая на основе современных достижений науки и техники и наилучшего сочетания критериев достижения целей охраны окружающей среды при условии наличия технической возможности её применения». Наилучшие доступные технологии (наилучшая существующая технология) призваны стать элементом более качественного и экономически обоснованного контроля и предотвращения негативного воздействия на окружающую среду с учетом особенностей конкретной отрасли промышленности. Основными целями природоохранных директив ЕС являются обеспечение комплексного предотвращения и контроля загрязнения на основе разработки и выдачи индивидуальных комплексных разрешений промышленным предприятиям, а также регулирование воздействий на всю окружающую среду в целом и обеспечение высокого уровня её охраны и защиты. Системой критериев для оценки воздействия на окружающую среду и получения выдаваемого в соответствии с требованиями Директивы комплексного разрешения в различных отраслях экономики являются НДТ. Российская делегация выразила заинтересованность в участии в работе новой экспертной группы по наилучшим до-

ступным технологиям в рамках Комитета по химии ОЭСР.

Российская делегация выразила заинтересованность в участии в работе новой экспертной группы по наилучшим доступным технологиям в рамках Комитета по химии ОЭСР.

3. Методы тестирования и оценка безопасности наноматериалов. При обсуждении вопросов безопасности наноматериалов представителями Роспотребнадзора было сообщено о созданной в Российской Федерации национальной системе регулирования нановеществ и наноматериалов. Следует отметить, что в настоящее время ОЭСР сделан акцент на необходимость развития нанобезопасности в условиях производства. Поддерживая мировые тенденции в области безопасности нанотехнологий, Российской Федерации также следует направить усилия на снижение риска воздействия нановеществ и материалов на работающих в данной отрасли.

Социальные и экономические выгоды от внедрения инструментария, подходов и рекомендаций ОЭСР. В рамках рассмотрения вопросов социальных и экономических выгод от внедрения инструментария, подходов и рекомендаций ОЭСР в части выявления химических веществ высокой степени риска и замены их безопасными аналогами, целесообразным является внедрение данного направления деятельности в практику развития национальной системы регулирования обращения химических веществ путем ограничения, запрещения наиболее опасных и замены их безопасными аналогами с учетом мировых тенденций.

Утверждение программы работы по окружающей среде, здравоохранению и безопасности (EHS) на 2017-2020 годы.

В основе программы лежит тесное взаимодействие правительств и промышленности для сохранения высокого уровня здоровья человека и охраны окружающей среды.

В связи с поддержкой осуществления программы по охране окружающей среды (UNEP) и Стратегического подхода к международному регулированию химическими веществами (SAICM, СПМРХВ), цели и задачи программы ОЭСР отражают цели устойчивого развития до 2020 года и ориентированы на достижение цели безопасного использования химических веществ на протяжении всего их жизненного цикла (от момента синтеза до захоронения).

ОЭСР имеет огромный опыт в разработке схем и инструментов, применяемых в рамках реализации СПМРХВ, и играет ведущую роль в некоторых вопросах регулирования химических веществ, таких как управление рисками перфторированных соединений, развитие по-

тенциала для обеспечения безопасности производимых наноматериалов и веществ, разрушающих эндокринную систему. Кроме того, научный опыт ОЭСР в управлении химическими веществами позволяет взять на себя ведущую роль в оценке эффективности схем регулирования химических веществ и в разработке набора наилучших практик в этой области.

Акцент в работе программы на 2017-2020 годы направлен на реализацию актов Совета ОЭСР, связанных с взаимным признанием данных в оценке химических веществ, с принципами испытаний ОЭСР, принципами надлежащей лабораторной практики и процедурами контроля за соблюдением.

Актуальной и неизменно развивающейся темой остается вопрос обеспечения безопасности в современной биотехнологии. Программой предусмотрены мероприятия, направленные на развитие регулирующего надзора трансгенных организмов в сельском хозяйстве, а также при производстве продуктов питания и кормов.

В области химической безопасности усилия стран-членов ОЭСР направлены на устранение дублирования работы и снижения нетарифных барьеров в торговле путем разработки систем по сбору, оценке и обмену информацией о потенциальных рисках химических веществ, обеспечивая тем самым основу системы взаимного признания данных.

Среди прочих вопросов программы ОЭСР большое значение уделено разработке новых инструментов оценки химических веществ.

Роль ОЭСР заключается в расширении нормативного использования комплексных подходов для тестирования и оценки химических веществ (IATA) с использованием таких инструментов как (Q)SAR, методов испытания без использования животных, а также новых научных подходов (например, неблагоприятные пути исхода, AOP).

Развитие новых альтернативных методов определения свойств химических веществ позволяет избежать расхождения в управлении отдельными видами химических веществ и, следовательно, избежать мер нетарифного регулирования в торговле.

Все заявления Российской делегации нашли положительный отклик со стороны Секретариата ОЭСР.

Следующее заседание Комитета ожидается в ноябре 2016 года.

*Директор ФБУЗ «Российский регистр потенциально опасных химических и биологических веществ» Роспотребнадзора,
Заведующий кафедрой гигиены РМАПО
Х.Х.Хамидулина*

НОВЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТОКСИКОЛОГИИ И СМЕЖНЫМ ДИСЦИПЛИНАМ

● Забродский П.Ф.

Иммунотоксикология фосфорорганических соединений. – Саратов: Издательство «Саратовский источник», 2016. – 289 с.
ISBN 978-5-91879-561-3

РЕЦЕНЗИЯ

на монографию П.Ф. Забродского
«Иммунотоксикология фосфорорганических соединений»

Монография доктора медицинских наук, профессора, заслуженного деятеля науки Российской Федерации П.Ф. Забродского «Иммунотоксикология фосфорорганических соединений» посвящена рассмотрению токсических и иммунотоксических свойств фосфорорганических соединений (ФОС), в частности, боевых отравляющих веществ и инсектицидов. Исследовано комбинированное действие различных ФОС и их антидотов на врожденный и адаптивный иммунитет. Проведена оценка влияния иммуномодуляторов на иммунные реакции, сниженные интоксикацией ФОС. В монографии представлены данные литературы и, в основном, собственных исследований о механизмах действия ФОС на систему иммунитета, а также способах коррекции постинтоксикационных нарушений иммунного гомеостаза.

Книга состоит из предисловия, 14 глав и заключения, содержит 81 таблицу, 36 иллюстраций. Список использованных источников отечественной и зарубежной литературы составляет 610 наименований.

В предисловии к монографии отмечено, что исследование воздействия ФОС, а также их комбинированного действия с антидотами на показатели врожденного и адаптивного иммунитета, а также изучение возможностей коррекции нарушений гуморальных и клеточных иммунных реакций как в случае острых, так и хронических интоксикаций является одной из актуальных проблем токсикологии. Это определяется использованием ФОС в сельском хозяйстве, промышленности, медицине, быту, продолжающимся уничтожением фосфорорганическими отравляющими веществами (реализация Федеральной целевой программы «Уничтожение запасов химического оружия в Российской Федерации»), возможностью химически опасных аварий с поражением людей, а также ростом интоксикаций данными антихолинэстеразными соединениями, формирующими вторичные иммунодефицитные состояния. В настоящее время нельзя исключить применение ФОС в качестве химического оружия (боевых отравляющих веществ), в террористических и криминальных целях. В 60 странах мира за 20 лет зарегистрировано более 34000 отравлений ФОС, при этом 73% случаев отравлений связано с их употреблением. В России больные с острыми отравлениями ФОС составляют до 3% пациентов, поступающих в специализированные токсикологические центры. Из них в ле-

чебных учреждениях погибает в настоящее время 20-24% больных. Несомненно, что в танатогенезе при отравлениях ФОС существенную роль играет нарушение патогенетических механизмов иммунного статуса.

В первых 3-х главах монографии приведены основные положения иммунологии и иммунотоксикологии, описаны экспериментальные методы оценки доиммунных факторов резистентности организма и иммунного статуса, дана общая характеристика ФОС.

Последующие главы книги посвящены изучению влияния острой и хронической интоксикации ФОС на врожденный и адаптивный иммунитет, комбинированному действию различных ФОС и их антидотов, а также ФОС и иммуномодуляторов на показатели системы иммунитета, механизмам иммунотоксического действия ФОС.

В главе 4 описано изменение показателей неспецифической резистентности организма (врожденного иммунитета) под влиянием ФОС. Описан открытый автором феномен, который реализуется вследствие «холинергического противовоспалительного пути (механизма)»: показано, что активация ацетилхолином $\alpha 7n$ -холинорецепторов ($\alpha 7nAChR$) макрофагов, моноцитов и нейтрофилов при интоксикации ФОС приводит к подавлению продукции ими провоспалительных цитокинов, вызывающему снижение летальности животных при сепсисе и различных инфекционных процессах.

В 5-й и 6-й главах описаны характеристика иммуномодуляторов, иммуномодулирующие свойства Т-активина, иммунофана и полиоксидония, их влияние на показатели врожденного иммунитета; 7-я глава посвящена влиянию ФОС на адаптивный иммунитет.

В главе 8 и 9 рассмотрены соответственно острое действие ФОС при их комбинированном действии с антидотами на показатели врожденного и адаптивного иммунитета; в главе 10 описано изменение функции Th1- и Th2-лимфоцитов, кооперации Т- и В-лимфоцитов, концентрации в крови кортикостерона, активности ацетилхолинэстеразы лимфоцитов, состояния перекисного окисления липидов под влиянием острой интоксикации ФОС в комбинации с антидотами; в главе 11 рассмотрена коррекция нарушений иммунного статуса после острого действия ФОС в комбинации с антидотами.

Изучению клеточных иммунных реакций, продукции цитокинов после хроническом воздействии ФОС, а также фармакологической коррекции выявленных изменений посвящена глава 12. В 13-й главе описано влияние хронической интоксикации ФОС на гуморальные иммунные реакции, кооперацию Т- и В-лимфоцитов и содержание цитокинов в крови, а также коррекция постинтоксикационных нарушений.

В последней 14-й главе рассмотрены изменение функции Th1- и Th2-лимфоцитов, концентрации в крови кортикостерона, активности эстераз Т-лимфоцитов, состояния пе-

рекисного окисления липидов после хронической интоксикации ФОС.

Автор вполне справедливо отмечает в разделе «Заключение», что монография не дает полных ответов на далеко неоднозначные и иммунологические феномены при воздействии ФОС. Нерешенность многих вопросов, противоречивость и неоднозначность результатов исследований механизмов нарушения показателей врожденного иммунитета, а также иммуногенеза при острой и хронической интоксикации ФОС предполагает дальнейшее изучение этой проблемы.

Несомненная актуальность темы монографии, обзор большого числа источников литературы, высокий методический уровень собственных исследований автора, достоверность полученных результатов, обоснованность выводов позволяет рассматривать работу П.Ф. Забродского

как значительный вклад в развитие существующих представлений о механизмах дисфункции системы иммунитета при интоксикации ФОС, в том числе, при комбинированном действии данных соединений и их антидотов, способах фармакологической коррекции постинтоксикационных нарушений иммунного статуса.

Книга имеет большую теоретическую значимость и практическую ценность.

Монография адресована токсикологам, иммунологам, фармакологам, биологам, физиологам, терапевтам и химикам.

**Член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор Б.А. Курляндский
Доктор медицинских наук, профессор
Х.Х. Хамидулина**

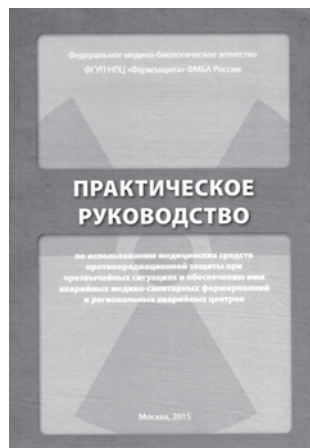
● **Гребенюк А.Н.,
Легеза В.И.,
Гладких В.Д. и др.**

Практическое руководство по использованию медицинских средств противорадиационной защиты при чрезвычайных ситуациях и обеспечению ими аварийных медико-санитарных формирований и региональных аварийных центров / Федеральное медико-биологическое агентство. – М.: Комментариум, 2015. – 304 с.

ISBN 978-5-94822-078-9

В Руководстве представлены современные возможности медикаментозной профилактики и терапии радиационных поражений, а также методические подходы к формированию резерва медицинских средств противорадиационной защиты для ликвидации медико-санитарных последствий радиационных аварий и катастроф.

В Руководстве изложены особенности организации медицинского обеспечения населения в условиях чрезвычайных ситуаций радиационной природы, показана роль и место медицинской противорадиационной защиты в системе мероприятий медицинской службы на этапах медицинской эвакуации, приведены алгоритмы оказания медицинской помощи пораженным, образцы форм специальной медицинской карты и карты предварительного гигиенического расследования радиационной аварии. Рассмотрены нормативно-правовые аспекты медицинского обеспечения населения в условиях чрезвычайных ситуаций, современные подходы к профилактике и лечению лучевой патологии с учетом особенностей различных клинических форм радиационных поражений и этапности оказания медицинской помощи. Обобщены существующие представления о фар-



макологических свойствах медикаментозных препаратов, формирующих современную систему медицинской противорадиационной защиты – средств профилактики лучевых поражений, лечебно-профилактических противолучевых средств, средств госпитальной терапии острых радиационных поражений. Представлены номенклатура и минимальные объемы содержания лекарственных препаратов и медицинских изделий в резервах медицинских средств для ликвидации медико-санитарных последствий чрезвычайных ситуаций радиационной природы, даны варианты комплектования аварийных медицинских упаковок для врачебно-сестринских бригад и медицинских учреждений, участвующих в оказании медицинской помощи пострадавшим из очагов радиационных поражений.

Руководство предназначено для обеспечения практической деятельности медицинского персонала здравпунктов АЭС, аварийных радиологических бригад, медицинских отрядов специального назначения, медико-санитарных частей, специализированных медицинских центров и госпиталей, а также для подготовки научно-педагогических работников и медицинских специалистов в системе послевузовского и дополнительного профессионального образования.

Руководство разработано коллективом авторов в составе: доктор медицинских наук, профессор А.Н. Гребенюк; лауреат государственной премии СССР, заслуженный деятель науки РФ, доктор медицинских наук, профессор В.И. Легеза; доктор медицинских наук, профессор В.Д. Гладких; доктор медицинских наук, доцент А.А. Тимошевский; доктор биологических наук В.Б. Назаров.

Рецензентами Руководства выступили профессор кафедры медицины катастроф Российской медицинской академии последипломного образования, заслуженный деятель науки РФ, доктор медицинских наук, профессор М.В. Васин, профессор кафедры военной токсикологии и медицинской защиты Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова, заслуженный работник высшей школы РФ, доктор медицинских наук, профессор Н.А. Смирнов.

Издание Руководства проведено в рамках Федеральной целевой программы «Обеспечение ядерной и радиационной безопасности на 2008 и на период до 2015 года».

ФБУЗ «РОССИЙСКИЙ РЕГИСТР ПОТЕНЦИАЛЬНО ОПАСНЫХ ХИМИЧЕСКИХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ» РОСПОТРЕБНАДЗОРА

ПРЕДЛАГАЕТ НОВУЮ ВЕРСИЮ

АВТОМАТИЗИРОВАННОЙ РАСПРЕДЕЛЕННОЙ ИНФОРМАЦИОННО-ПОИСКОВОЙ СИСТЕМЫ (АРИПС) «ОПАСНЫЕ ВЕЩЕСТВА», предоставляющей широкий спектр возможностей при разработке паспортов безопасности, MSDS, проектов выбросов, сбросов, классификации отходов производства и потребления, проведении мониторинга, оценки риска, экспертных работ.

АРИПС «ОПАСНЫЕ ВЕЩЕСТВА» НОВАЯ ВЕРСИЯ – электронная постоянно пополняемая база данных химических веществ, в том числе прошедших государственную регистрацию в системе Роспотребнадзора. По техническим характеристикам **АРИПС «ОПАСНЫЕ ВЕЩЕСТВА» НОВАЯ ВЕРСИЯ** представляет собой продукт, созданный с использованием последних достижений в области программирования. Использование современных методов разработки программного обеспечения позволило существенно расширить возможности предоставления информации. **АРИПС «ОПАСНЫЕ ВЕЩЕСТВА» НОВАЯ ВЕРСИЯ** содержит исчерпывающие сведения из ведущих отечественных и зарубежных баз данных. Вся информация представлена в структурированной форме, подобной информационной карте, составляемой на вещество при его государственной регистрации.

АРИПС «ОПАСНЫЕ ВЕЩЕСТВА» НОВАЯ ВЕРСИЯ включает в себя:

- физико-химические характеристики, данные о хранении, транспортировке, утилизации, пожаровзрывоопасность
- параметры токсикометрии (показатели острой токсичности при различных путях поступления, кумулятивности, оценку специфических и отдаленных эффектов)
- показатели экологической безопасности
- гигиенические и экологические нормативы: ОБУВ и ПДК загрязняющих веществ в атмосферном воздухе населенных мест, ОБУВ и ПДК вредных веществ в воздухе рабочей зоны, ОДУ и ПДК химических веществ в воде водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования и питьевой воды, ПДК и ОДК в почве, ДУ в продуктах питания, ПДК и ОБУВ вредных веществ для воды водных объектов, имеющих рыбохозяйственное значение
- классы (категории) опасности по влиянию на

здоровье человека, окружающую природную среду, а также обусловленные физико-химическими свойствами в соответствии с СГС

- коды и фразы риска, маркировку, номера ООН, КЭМ и номера аварийных карточек при железнодорожных, морских и других видах перевозки
- нормативные и библиографические данные.

Предлагаемый программный продукт предоставляет пользователю следующие возможности:

- просмотр полной информации о веществе (более 300 характеристик)
- поиск конкретного вещества с одновременным использованием более 50 условий
- ускоренный поиск вещества по фрагменту названия IUPAC, торговому названию, синониму, номерам CAS, RTECS и EINECS, брутто формуле, дате и сроку регистрации
- вывод в файл, на печать, просмотр информации по конкретному веществу, списку веществ, сформированных в результате поиска по заданным параметрам
- актуализации и пополнения базы данных новыми веществами **АРИПС «ОПАСНЫЕ ВЕЩЕСТВА» НОВАЯ ВЕРСИЯ**

Минимальные требования к компьютеру: процессор Celeron 1,8, оперативная память – 1GB, свободное место на жестком диске 100 MB;

Требования к программному обеспечению: Windows XP Professional SP2, Windows Office 2003.

Более детальную информацию Вы можете найти на сайте www.RPOHV.ru

Если Вас заинтересовала эта информация, Вы можете связаться с нами и оставить свою заявку:
Адрес: 117105, Москва, Варшавское шоссе, 19А
Многоканальный телефон: (499) 940-97-87
Факс: (499) 940-97-75
E-mail: secretary@rphv.ru
Веб-сайт: www.rphv.ru, www.rphbv.ru