ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ ВЕСТНИК

Toxicological Review

Научно-практический журнал

Издается с июля 1993 года, выходит 1 раз в 2 месяца

№ 3 (120), **2013**

СОДЕРЖАНИЕ

УДК 615.065

Ж.А. Лисовик,
К.К. Ильяшенко,
П.Г. Рожков,
Е.А. Лужников

ГБУЗ «НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения» г. Москвы

Новый взгляд на токсикометрическую оценку острых отравлений клозапином

При сопоставлении у 48 больных клинических симптомов отравления клозапином с пороговым, критическим и смертельным его уровнями показано, что необходимо учитывать не только эффективную концентрацию клозапина в сыворотке крови, но обязательно и эффективные концентрации его фармакологически активных метаболитов – норклозапина и азотсодержащего оксида.

Ключевые слова: *клозапин, острые отравления, норклозапин, клозапин-N-оксид, токсикометрия.*

Введение. В общей структуре заболеваний химической этиологии наибольший удельный вес занимают отравления препаратами психотропного действия. Среди них в последние годы значительно увеличилось количество острых отравлений клозапином (Кл). Острые отравления Кл отличаются тяжелым течением и летальностью, достигающей 10%. Основной причиной отравлений являются суицидальные попытки, вместе с тем существуют и криминальные отравления в сочетании с алкоголем [4, 8, 10].

Кл по химической структуре относится к трициклическим соединениям дибензодиазепинового ряда: 8-хлор-11-(4-метил-1-пиперазинил)-5H-дибензо-[b,e]-[1,4]-диазепин [2]. Он хорошо всасывается из желудочно-кишечного тракта, его биодоступность составляет 27–60%, связывание белками сыворотки до 95%, пик концентрации в крови достигает через 2,5 часа после приема, период полувыведения из крови 6–12–30 ч. С мочой в неизмененном виде выводится 2–5% от дозы [7, 12]. Кл интенсивно метаболизируется в печени. В процессе деметилирования и окисления ароматического кольца образуются фармакологически активные метаболиты: клозапин-N-десметил(норклозапин) и клозапин-N-оксид [5, 11, 12, 13]. Следует отметить, что азотсодержащие оксиды относятся к токсичным продуктам, способным повреждать мембраны клеток, структурные и ферментные белки, а также нарушать синтез нуклеиновых кислот [11, 12, 13]. Существует мнение, что клозапин-N-оксид является активным метаболитом и вносит свой вклад в наблюдаемые терапевтический и побочные эффекты тем, что восстанавливается (биоредукция) до Кл. Этому способствует бактериальная нитроредуктаза желудочно-кишечного тракта и ферменты, локализованные в микросомальных фракциях печени [5, 11, 12, 13].

Особенностью данного препарата являются близкие, порой пересекающиеся, значения его терапевтических и токсических концентраций. Диапазон эффективной терапевтической концентрации по данным зарубежных авторов составляет 0,10–0,319–0,771 мкг/мл, токсических – от 0,5 до 3,0 мкг/мл, а смертельных – от 1,5 до 11,0 мкг/мл [8, 9, 12, 15, 17]. При этом следует отметить, что авторы в своих исследованиях учитывали только концентрации субстанции.

На основе сопоставления клинических признаков отравления и концентрации токсикантов в крови в первые часы после приема токсикантов В.Н. Дагаев, Э.Г. Горини определили [3]:

а) «пороговый» уровень токсикантов – минимальную концентрацию токсичного вещества в плазме крови, вызывающую клинические признаки отравления, исход его обычно благоприятный, так как интенсивность химической травмы не превышает компенсаторных возможностей организма;

б) «критический» уровень включает в себя те границы концентрации токсиканта в плазме крови, при которых возникают критические нарушения жизнедеятельности организма, а исход интоксикации становится неопределенным, так как во многом зависит от прочих факторов;

в) «смертельный» уровень обычно имеет летальный исход, обусловленный несовместимой с жизнью интенсивностью химической травмы.

Ранее нами [3, 4, 10] были установлены пороговый, критический и смертельный уровни Кл. Однако в тот период не было обращено внимание на концентрации его активных метаболитов: норклозапина и особенно Кл-N-оксида. Это явилось существенным упущением, что было подтверждено дальнейшими клиническими наблюдениями. Так, у больных с поздним поступлением в стационар после приема Кл в некоторых случаях в крови обнаруживали его пороговые концентрации, тогда как клиническая картина соответствовала критическим уровням. После проведения детоксикационных мероприятий в сыворотке крови, как правило, Кл не обнаруживали, но в отдельных случаях через несколько часов при соответствующей клинической картине при повторных анализах вновь регистрировали его появление в терапевтических или пороговых концентрациях при наличии активных метаболитов.

Цель настоящего исследования – проведение токсикометрической оценки острых отравлений Кл с учетом концентраций фармакологически активных метаболитов: клозапин-N-десметил(норклозапин) и клозапин-N-оксид.

Материалы и методы исследования. Проведено клиническое обследование 48 больных с острыми отравлениями Кл в возрасте 28–40 лет, со сроками, прошедшими от момента отравления до госпитализации, от 1 до 3 часов, а также исследована их сыворотка крови. Скрининг-диагностику препаратов проводили в моче методом тонкослойной хроматографии. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) использовался для идентификации и количественного определения Кл, Кл-N-десметила и Кл-N-оксида в сыворотке крови в системе LAB.QLP на автоматическом анализаторе REMEDI HS фирмы BIORAD (США) с компьютерной идентификацией результатов анализа. Подготовку проб сыворотки крови к анализу осуществляли по модифицированной нами методике ультрафильтрации и центрифугирования [6]. Видоизмененный нами алгоритм подготовки сыворотки крови предусматривал: 1. Центрифугирование образцов сыворотки крови для отделения белков через тефлоновый фильтр (диаметр пор 0,22 мкм) в течение 5 минут при 5 000g. 2. Дополнительное центрифугирование отфильтрованного образца для лучшей очистки при 10 000g в течение 3 минут. 3. К отфильтрованному образцу сыворотки крови добавляли два внутренних стандарта для определения относительного времени удерживания и количественного определения. LOD-минимальный лимит детектирования (мкг/мл) в результате измененного нами алгоритма снизился в два раза и составил 0,01 мкг/мл, что позволило определять не только токсические концентрации, но и терапевтические. Определяли эффективную (действующую) концентрацию Кл и его метаболитов в сыворотке крови. Под эффективной концентрацией понимают свободные, несвязанные с белками сыворотки крови, молекулы лекарственных веществ, доступные для клеточных рецепторов, находящиеся в динамическом равновесии с молекулами, связанными с белками (депо) [1].

Идентификацию осуществляли автоматически по относительным временам удерживания, по характеристикам УФ-спектров, включая расчетные параметры SF (фактор совмещенности) и 2DI (2-я производная спектра), по RATIO (1–6 позиции) конфигурации пиков путем сравнения с библиотечными данными.

Результаты и обсуждение. Сопоставление клинических признаков отравления Кл, соответствующих пороговому, критическому и смертельному уровням его в крови показало, что на самом деле эта симптоматика определяется суммой эффективных концентраций самого Кл и активных метаболитов.

В таблице представлены концентрации Кл и его активных метаболитов в сыворотке крови, суммарно соответствующие пороговому, критическому и смертельному уровням токсикантов. Обращает на себя внимание тот факт, что при пороговых уровнях концентрация в сыворотке крови фармакологически активного метаболита норклозапина (НорКл) находилась в диапазоне от 0,06 до 0,24 мкг/мл (соотношение Кл/НорКл было почти 1:1), при критических оно составляло 2:1, а при смертельных достигало 3:1. На наш взгляд, такую ситуацию можно объяснить замедлением биотрансформации Кл при его высоких концентрациях. Данные таблицы демонстрируют, что при пороговом уровне азотсодержащие оксиды не обнаруживаются, тогда как по мере увеличения концентрации Кл от критической до смертельной происходит их рост в сыворотке крови. С одной стороны, это может быть обусловлено снижением детоксикационных систем организма в связи с большой токсической нагрузкой и уменьшением их элиминации. С другой – можно предположить, что при высоких концентрациях в крови азотсодержащего оксида, вследствие его способности повреждать структурные и ферментные белки, снижается связь Кл с белками сыворотки и повышается его эффективная концентрация, что, в свою очередь, приводит к дальнейшему накоплению Кл-N-оксида в крови. Таким образом создается порочный круг. Определенный вклад в этот процесс, вероятно, вносит и биоредукция Кл-N-оксида [5].

При длительной экспозиции Кл, а также на фоне проведения лечения, когда снижается его эффективная концентрация, в биосредах обнаруживают его активные метаболиты, которые в данной ситуации определяют тяжесть клинического проявления интоксикации.

Заключение. Проведенные исследования показали, что при токсикометрической оценке острых отравлений клозапином следует учитывать не только его эффективную концентрацию в сыворотке крови, но и эффективные концентрации норклозапина и его азотсодержащего оксида.

Таблица

Концентрации клозапина и его активных метаболитов в сыворотке крови больных при пороговых, критических и смертельных уровнях

Токсикант, мкг/мл	Эффективная концентрация Кл и его метаболитов		
	Пороговая (n=18)	**Критическая (n=18)**	**Летальная (n=12)**
Кл M±m диапазон	0,12±0,06 0,08–0,21	1,16±0,57 0,50–1,78	3,5±1,5 2,0–11,0
Кл-N-дезметил M±m диапазон	0,14±0,05 0,06–0,24	0,61±0,07 0,20–0,63	0,98±0,3 0,6–1,5
Кл-N-оксид M±m диапазон	Не обнаружен	0,15*, 0,20*	0,52±0,05 0,15–0,73

* Единичные случаи

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Альберт А.* Избирательная токсичность: физико-химические основы терапии. В 2-х т. Т. 1, 2. /
А. Альберт; пер. с англ. М. А. Думпис, М. Б. Ганиной; под ред. В. А. Филова. М.: Медицина, 1989.
2. Большая Российская Энциклопедия лекарственных средств. В 2-х т. Т. 2. М.: Ремедиум, 2002. – 821 с.
3. *Дагаев В.Н.* Принципы диагностики и прогнозирования критических состояний при острых отравлениях / В.Н. Дагаев, Э.Г. Горин // Всесоюзная учредительная конференция по токсикологии, 25–27 ноября, 1980 г., г. Москва: Тезисы докл. М., 1980. – С. 164.
4. *Ильяшенко К.К.* Особенности острых отравлений клозапином / К.К. Ильяшенко, Е.А. Лужников,
Ж.А. Лисовик [и др.] // Токсикологический вестник, 2009. – № 2. – С. 2–6.
5. *Лакин К.М.* Биотрансформация лекарственных веществ / К.М. Лакин, Ю.Ф. Крылов. М.: Медицина, 1981. – 342 с.
6. *Лисовик Ж.А.* Усовершенствованный способ пробоподготовки сыворотки крови для фармакологического и токсикологического анализа методом ВЭЖХ /
Ж.А. Лисовик, С.Д. Безбородный // Клиническая лабораторная диагностика, 1999. – № 11. – С. 47.
7. *Селезнев Е.Ф.* Количественная оценка некоторых кинетических параметров лекарственных веществ у людей / Е.Ф. Селезнев // Фармация, 1987 – № 3. – С. 79–88.
8. *Могош Г.* Острые отравления. Диагноз, лечение / Пер. с венгр. Г. Могош. – Бухарест, 1994. –
С. 324–579.
9. Drug Information for the Health Care Professional. USP DI (1991),11th Ed. – P. 940–943.
10. *Luzhnikow E.A.* Assesment of the severity of acute clozapine (azaleptine) poisonings from the position of clinical toxicometry / E.A. Luzhnikow, K.K. Iliashenko, Z.A. Lisovik [et al.]: [XXIVth International congress of European Association of Poison Centres and Clinical Toxicologists, 1–4 June 2004, Strasburg, France] // EAPCCT. – 2004. – Vol. 154. – P. 95.
11. *Mannering G. L.* Microsomal enzyme systems which catalyze / G.L. Mannering // Fundamentals of drug metabolism and drug disposition / ed. B. N. LaDu, H. C. Mandel, E. L. Way.-NY, Baltimore, Williams & Wilkins, 1971. – P. 206–252.
12. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of clozapine / M.W. Jann, S.R. Grimsley, E.C. Gray, W.H. Chang // Clin Pharmacokinet, 1993. – Vol. 24, № 2. –
P. 161–176.
13. *Pfeifer S.* Pharmakokinetik und Biotransformation /
S. Pfeifer, H. Borchert. – Berlin: Verlag Volk und Gesundheit, 1980.
14. *Seyffart G.* Poison Index: The Treatment of Acute Intoxication / G. Seyffart. – New York: Pabst Science Publishers, 1997. – P. 173–179.
15. *Stead A.H., Moffat A.C.* A collection of therapeutic, toxic and fatal blood drug concentration in men / A.H. Stead, A.C. Moffat // Hum Toxicol., 1983. – Vol. 2, №3. – P. 437–464.
16. *Testa B.* Drug Metabolism: Chemical and Biochemical Aspects / B. Testa, P. Jenner. – **NY**: Dekker, **1976. – 297 p.**
17. Uges: Drug concentrations. Therapeutic and toxic Drug Concentrations // Bull TIAF, 1996. – Vol. 26. – Suppl 1. – P.1–34.

Zh.A.Lisovik , K.K. Ilyashenko, P.G.Rozhkov, Ye.A.Luzhnikov

A new look at the toxicometric assessment of acute intoxication with Clozapine

N.V. Sklifosovsky Research Institute of Emergency Medical Care, Moscow

While comparing 48 patients having clinical symptoms of poisoning by Clozapine with its threshold, critical and lethal levels, it was shown that it is necessary not only to take into account an effective concentration of Clozapine in the blood serum but also obligatorily effective concentrations of its pharmacologically active metabolites- Norclozapine and nitrogen-containing oxide.

Материал поступил в редакцию 03.04.2013 г.

УДК 616-099 + 616.9

А.Е. Левенцова,
В.К. Макаров

ГБОУ ВПО «Тверская ГМА» Минздрава России, г. Тверь

Состояние биологических мембран у больных острым инфекционным и острым алкогольным гастроэнтеритами

Работа посвящена изучению влияния алкоголя и бактериальной инфекции на состояние биологических мембран. Для определения состояния мембран изучали фосфолипидные фракции сыворотки крови, так как известно, что фосфолипиды входят в состав мембран энтероцитов и, соответственно, всякое изменение содержания их на мембране приводит к изменению их содержания в крови. Исследовали показатели фосфолипидных фракций сыворотки крови у 50 здоровых лиц, 50 больных острым алкогольным гастроэнтеритом и 50 пациентов острым инфекционным гастроэнтеритом.

Ключевые слова: инфекция, алкоголь, гастроэнтерит, фосфолипиды.

Введение. Кишечные инфекции с синдромом гастроэнтерита широко распространены во всех странах мира [2].

В настоящее время выделяют инфекционный, токсический и алиментарный острый энтерит или гастроэнтерит, в том числе в результате употребления крепких алкогольных напитков [5], так называемый острый алкогольный гастроэнтерит. То есть, одним из важнейших этиологических факторов острого гастроэнтерита является злоупотребление алкоголем [13].

Алкогольный гастроэнтерит характеризуется наличием тошноты, рвоты, болей в животе, повторным, обильным жидким стулом [1]. Лица с подобной симптоматикой зачастую попадают в инфекционный стационар, где встает вопрос дифференциальной диагностики кишечных инфекций с синдромом гастроэнтерита и алкогольного гастроэнтерита.

Алкоголь является главной причиной заболеваемости и смертности в мире [8, 15], способствует восприимчивости человека к инфекционным заболеваниям [9, 11] и приводит к дестабилизации клеточных и внутриклеточных мембран [10].

Цель нашей работы заключалась в определении влияния алкоголя и бактериальной (сальмонеллёзной) инфекции на состояние биологических мембран, используя данные спектра общих липидов и фосфолипидов сыворотки крови.

Материалы и методы исследования. Нами были исследованы показатели липидного спектра сыворотки крови у 50 здоровых лиц, 50 больных острым алкогольным гастроэнтеритом (ОАГЭ) и 50 пациентов острым инфекционным гастроэнтеритом (ОИГЭ). В качестве эталона инфекционного гастроэнтерита служили больные типичным вариантом гастроинтестинальной формы сальмонеллёза, вызванным Sal. enteritidis, средней степени тяжести, с наличием частого энтеритного стула. Все больные с острым алкогольным гастроэнтеритом поступали в стационар после значительной алкогольной нагрузки в течение нескольких дней. Все обследованные лица были в возрасте от 20 до 60 лет.

Средний возраст больных сравниваемых групп был близким. Так, у больных ОИГЭ средний возраст составил 34,3±2,3 года, у больных ОАГЭ – 37,3±1,5 года. Большинство обследованных лиц во всех группах составляли лица мужского пола.

Для определения состояния мембран изучались фосфолипидные фракции сыворотки крови, так как известно, что фосфолипиды входят в состав клеточных мембран, в том числе энтероцитов, и соответственно всякое изменение содержания их на мембране приводит к изменению содержания их в сыворотке крови.

Липиды выделяли традиционным способом по Фолчу [12] и фракционировали модифицированным методом с определением процентного содержания минорных липидных компонентов сыворотки крови (например, лизопроизводных фосфолипидов) одновременно с основными липидными фракциями. Для определения процентного содержания отдельных липидных фракций использовался денситометр Shimadzu CS-9000 [7].

Общие липиды определяли по Маршу [14]. Изучено относительное содержание следующих фракций общих липидов: общих фосфолипидов (ФЛ), свободного холестерина (СХ), триглицеридов (ТГ), эфиров холестерина (ЭХ), а также фракций общих фосфолипидов – суммарных лизофосфолипидов (ЛФЛ), сфингомиелина (СМ), фосфатидилхолина (ФХ), фосфатидилэтаноламина (ФЭ).

Результаты содержания каждого липида выражались в процентах относительно уровня общих липидов или общих фосфолипидов у каждого больного.

Степень проницаемости мембран определяли по коэффициенту проницаемости [СМ]/[ФХ], разработанному В.И. Гуриным [4]. Понижение значений данного коэффициента указывало на уменьшение липидной «жидкостности» мембран, то есть на увеличение ее проницаемости. Для определения активности эндогенных фосфолипаз использовали коэффициент активности фосфолипаз [ФХ]/[ЛФХ], предложенный Н.Е. Кучаренко и соавт. [6] в нашей модификации [ФХ+ФЭ]/[ЛФЛ]. Повышение его значений обратно пропорционально снижению активности фосфолипаз. Кроме того, применяли коэффициент вязкости биомембран, который представляет собой отношение свободного холестерина к общим фосфолипидам, из которых и состоят мембраны клеток [СХ/ФЛ].

Все показатели пациентов проверялись на предмет выявления эмпирических функций их распределения и соответствие этих функций нормальной функции распределения (функция Гаусса). Для этой процедуры применялся критерий согласия Шапиро-Уилка, который применим при небольшом количестве измерений ($n < 50$). Сравнение групп проводилось двумя способами: для нормально распределенных показателей применялся Т-критерий Стьюдента, а в случае анормальности функций распределения – U-критерий Манна-Уитни.

Результаты и обсуждение. Исследование соотношений [ФХ+ФЭ]/[ЛФЛ] показало, что у больных ОИГЭ, по сравнению со здоровыми лицами, наблюдалось значительно более высокое его значение (таблица), а у пациентов с ОАГЭ – более низкое.

Таблица

Значения соотношений фракций фосфолипидов сыворотки крови у здоровых лиц, больных острым алкогольным и больных острым инфекционным гастроэнтеритами

Сравниваемые группы	n	Наименование коэффициентов		
		[ФХ+ФЭ]/[ЛФЛ] коэффициент активности фосфолипаз	[СМ]/[ФХ] коэффициент проницаемости биомембран	[СХ]/[ФЛ] коэффициент вязкости биомембран
Здоровые лица	50	1,7 ± 0,07	0,6±0,01	0,7 ±0,01
Больные острым алкогольным гастроэнтеритом (ОАГЭ)	50	1,5±0,04[1]	0,7±0,02[3]	1,1±0,03[3]
Больные острым инфекционным гастроэнтеритом (ОИГЭ)	50	3,9±0,1[3]	0,5±0,01[3]	0,7±0,02
P_1		<0,001	<0,001	<0,001

Примечание. [1,2,3] – достоверность различий в группах в сравнении со здоровыми лицами (1 – P < 0,05; 2 – P < 0,01; 3 – P < 0,001).
P_1 – достоверность различий между больными острым инфекционным гастроэнтеритом и острым алкогольным гастроэнтеритом.

Соотношение [СМ]/[ФХ] у больных ОИГЭ оказалось достоверно более низким, а у больных ОАЭ более высоким по сравнению с нормой.

Коэффициент [СХ]/[ФЛ] у больных с ОАГЭ был достоверно выше, а у пациентов с ОИГЭ не отличался от нормы.

Выявлено почти в 3 раза более высокое значение соотношения [ФХ+ФЭ]/[ЛФЛ] у больных ОИГЭ по сравнению с пациентами с ОАГЭ. Цифровые значения соотношения [СМ]/[ФХ] у больных ОИГЭ были достоверно ниже, чем у пациентов с ОАГЭ. Соотношение [СХ]/[ФЛ] у больных ОАГЭ оказалось самым высоким по сравнению с больными других групп.

Более высокие значения соотношения [ФХ+ФЭ]/[ЛФЛ] у больных ОИГЭ в сравнении со здоровыми лицами и пациентами с ОАГЭ указывают на значительное снижение активности эндогенных фосфолипаз, что приводит к накоплению на биологических мембранах лизофосфолипидов и к их деструкции. У пациентов с ОАГЭ наблюдался обратный процесс – значение соотношения [ФХ+ФЭ]/[ЛФЛ] самое низкое (указывает на повышение активности фосфолипаз).

Уменьшение соотношения СМ/ФХ показывает, что при ОИГЭ происходит увеличение «текучести», а значит и проницаемости, нестабильности биологических мембран. При ОАГЭ наблюдается обратная реакция в виде увеличения значения коэффициента СМ/ФХ, что отражает уменьшение текучести биологических мембран энтероцитов. Это может приводить к двухфазности мембранного геля. Увеличение соотношения [СХ]/[ФЛ] под воздействием алкоголя у больных ОАГЭ указывает на образование двухфазной системы, то есть на увеличение микровязкости биомембран [3]. Эти два процесса ведут к повышению проницаемости энтероцитов и диффузии жидкости в просвет кишечника.

Заключение. У больных острым инфекционным и алкогольным гастроэнтеритами страдает состояние биологических мембран энтероцитов.

При остром инфекционном гастроэнтерите наблюдается увеличение текучести мембран, а при остром алкогольном гастроэнтерите – увеличение микровязкости мембран. В результате возникает повышение их проницаемости и как следствие – диарея (энтерит).

Механизм диареи у больных острым инфекционным и острым алкогольным гастроэнтеритом различен. Причина диареи при остром алкогольном гастроэнтерите – увеличение микровязкости биомембран, а при остром инфекционном гастроэнтерите – увеличение текучести биомембран энтероцитов.

Острый инфекционный гастроэнтерит приводит к значительному снижению активности эндогенных фосфолипаз, а острый алкогольный гастроэнтерит – к повышению.

Значение соотношения [СХ]/[ФЛ] выше 0,8 может служить дополнительным тестом для

подтверждения алкогольной этиологии гастроэнтерита.

Значение соотношения [ФХ+ФЭ]/[ЛФЛ] выше 2,0 может служить дополнительным тестом для подтверждения инфекционной этиологии гастроэнтерита.

Список литературы

1. *Бонитенко Ю.Ю., Ливанов Г.А., Бонитенко Е.Ю., Калмансон М.Л.* Острые отравления алкоголем и его суррогатами (патогенез, клиника, диагностика, лечение). Пособие для врачей. С.-Пб.: Лань, 2000. – 112 с.

2. *Воротынцева Н.В., Мазанкова Л.Н.* Острые кишечные инфекции у детей. М.: Медицина, 2001. – 480 с.

3. *Галлер Г., Ганефельд М., Яросс В.* Нарушения липидного обмена (диагностика, клиника, терапия). Пер. с нем. Ю.И. Коршиковой. М.: Медицина, 1979. – 335 с.

4. *Гурин В.И.* Обмен липидов при гипертермии, гипотермии и лихорадке. Минск, 1986. – 192 с.

5. *Комаров Ф.И., Гребенев А.Л.* Болезни органов пищеварения // Воробьёв А.И. Справочник практического врача. 7-е изд. М.: Издательский Дом ОНИКС, 2000. – С. 134–172.

6. *Кучаренко Н.Е., Васильев А.Н.* Липиды. Киев, 1985. – 247 с.

7. *Макаров В.К.* // Фосфолипидный спектр сыворотки крови в диагностике разных стадий комбинированного вирусно-алкогольного поражения печени // Биомедицинская химия, 2004. – Т. 50, вып. 50. – С. 498–501.

8. *Нужный В.П., Харченко В.И., Акопян А.С.* Избыточное потребление алкоголя – весомый фактор риска болезней системы кровообращения и высокой смертности населения (обзор) // Терапевтический архив, 1998. – № 10. – С. 57–64.

9. *Огурцов П.* Алкогольная ситуация в России и алкогользависимая патология // Врач, 1998. – № 11. – С. 6–9.

10. *Adachi J.* Membrane disorder and free radical // Nihon Hoigaku Zasshi, 2000. – Nov., Vol. 5, № 4 (3). – P. 356–360.

11. *Ceccanti M., Attili A., Balducci G., Attilia F. et al.* Acute alcoholic hepatitis // J. Clin. Gastroenterol., 2006. – Vol. 40, № 9. – P. 833–841.

12. *Folch J., Lees M., Stanley G.H.G.* A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues // J. Biol. Chem., 1957. – Vol. 226. – P. 497–509.

13. *Gracey M., Bobongie F.* Hospitalization of Aboriginal adults for digestive disorders in Western Australia, 1989-91 // Gastroenterol. Hepatol., 1995. – Vol. 10, № 3. – P. 313–318.

14. *Marsh J.B., Weinstein P.B.* Single charring methods for determination of Lipids // J. Lip., 1966. – Vol. 7 – P. 574–576.

15. *Ramaiah S., Rivera C., Arteel G.* Early-phase alcoholic liver disease: an update on animal models, pathology, and pathogenesis // J. Toxicol., 2004. – Vol. 23, № 4. – P. 217–231.

A.Ye. Leventsova, V.K. Makarov

The state of biological membranes in patients with acute infectious and acute alcohol-based gastroenteritis

Tver State Medical Academy

The study is dedicated to the influence of alcohol and bacterial infection on the state of biological membranes. To determine the membrane state, phospholipids fractions in blood serum were studied as it is known that phospholipids enter into the composition of enterocytes membranes and accordingly any changes in their content in the membrane lead to changes in their content in blood. Parameters of phospholipid fractions in blood serum were studied in 50 healthy people, 50 patients with acute alcohol-based gastroenteritis and 50 patients with acute infectious gastroenteritis.

Материал поступил в редакцию 27.02.2012 г.

УДК 54-31 : 615.91

Экспериментальное исследование острой токсичности суперпарамагнитных наночастиц Fe_3O_4 и нанокомплекса [ДНК+Fe_3O_4]

С.Ф.Вершинина[1], А.Н.Стуков[2], Е.И. Якубович[1], Р.Б. Самсонов[1], Д.М. Лавникевич[1], В.И. Евтушенко[1]

[1]ФГБУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий» Минздрава России, Санкт-Петербург.
[2]ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург.

В работе на мышах SHR (самцах и самках) определена острая токсичность созданных в ФГБУ РНЦРХТ суперпарамагнитных наночастиц на основе Fe_3O_4 и нанокомплекса [ДНК+Fe_3O_4]. Были испытаны дозы 2, 4, 6, 8 и 10 ммоль/кг. Результаты исследования продемонстрировали малую токсичность препаратов. 100% гибели животных не наблюдалось ни при одной из доз. Среднесмертельная доза (LD_{50}) при испытании парамагнетика Fe_3O_4 для самок составила 18,8 ммоль/кг, для самцов – 30 ммоль/кг. LD_{50} при испытании нанокомплекса [ДНК+Fe_3O_4] для самок была равна 11,2 ммоль/кг, для самцов – 11,5 ммоль/кг.

Ключевые слова: *острая токсичность, мыши SHR, суперпарамагнитные наночастицы Fe_3O_4, нанокомплекс [ДНК+Fe_3O_4].*

Введение. Токсичность противоопухолевых препаратов представляет важнейшую клиническую проблему, с которой непосредственно связаны результаты лечения опухолевых заболеваний [1]. Одним из путей снижения токсических эффектов лекарственных антибластомных средств является направленный транспорт препаратов непосредственно в опухолевый очаг. В этом отношении перспективным может быть создание суперпарамагнитных наночастиц и их комплексов с терапевтическими агентами, с помощью которых под действием внешнего магнитного поля можно направленно доставить противоопухолевые препараты, включая ДНК-вакцины, непосредственно к опухоли, не повреждая здоровые ткани. Вместе с тем вопрос токсичности наночастиц и их комплексов в настоящее время недостаточно изучен и нуждается в детальном исследовании по причине особенностей их физико-химических свойств, таких как высокая дисперсность, огромная удельная поверхность, высокая напряженность электростатического поля и избыточная свободная энергия поверхности [2]. Поэтому перед новой дисциплиной – нанотоксикологией – стоит двоякая задача, прежде всего – это анализ негативного воздействия нанообъектов на организм человека и далее – разработка способов нейтрализации этих воздействий путем модификации физико-химических свойств наночастиц. При этом, несмотря на разработку различных *in vitro* экспресс-систем для оценки биологических эффектов наночастиц, включая токсичность, исследования на экспериментальных животных остаются «золотым стандартом» [5].

В настоящей работе оценена острая токсичность созданных в ФГБУ РНЦРХТ суперпарамагнитных наночастиц Fe_3O_4 и нанокомплекса [ДНК+Fe_3O_4] на животных.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках Госконтракта № 16.552.11.7021 с использованием оборудования ЦКП «Биотехнологический центр исследования экспрессии генома».

Материалы и методы исследования. В работе использовались созданные в ФГБУ РНЦРХТ суперпарамагнитные наночастицы на основе Fe_3O_4 и нанокомплекс, состоящий из наночастиц Fe_3O_4, на которых сорбирована фрагментированная ультразвуком ДНК из тимуса теленка со средним размером 300 пар оснований. Емкость наночастиц составляла 2,5 мкг ДНК на 1 мг Fe_3O_4.

Синтез суперпарамагнитных наночастиц на основе Fe_3O_4 производился в лаборатории генной инженерии ФГБУ РНЦРХТ следующим образом.

Одномолярные растворы $FeCl_2$ и $FeCl_3$ (Merck, Германия) фильтровали через фильтры Millipore с диаметром пор 0,45 мкм и смешивали в соотношении 2:1. Смесь дегазировали и титровали раствором NH_4OH для доведения pH до 11, после чего сосуд для синтеза частиц помещали в емкость с холодной водой и обрабатывали образовавшуюся суспензию ультразвуком при мощности 18 мВт и частоте 44 кГц в течение 10 минут. Суспензию наночастиц оставляли «созревать» в течение 1 часа при температуре +20^{0}С, затем образовавшиеся суперпарамагнитные наночастицы (СПМЧ) промывали 3 раза деионизованной водой. Наночастицы собирали с помощью ниобиевого магнита на стенке поликарбонатного стакана и аккуратно сливали супернатант через край стакана. Магнит убирали, наночастицы ресуспендировали в 3–5 объемах деионизованной воды и оставляли на 20 мин при температуре +20^{0}С. Процедуру отмывки повторяли 2 раза. Объём осадка полученных суперпарамагнитных наночастиц измеряли и приготавливали 20% (v/v) суспензию наночастиц в деионизованной воде, аликвотировали и хранили при +4^{0}С.

При приготовлении нанокомплекса [ДНК+Fe_3O_4] количество ДНК рассчитывали из соотношения 2,5 мкг ДНК на 1 мкг частиц. Сорбцию ДНК проводили в объеме 200 мкл суспензии частиц в течение 1 минуты, затем осаждали частицы с помощью магнита, удаляли супернатант и ресуспендировали частицы в 200 мкл физиологического раствора. Вышеописанную отмывку частиц от возможных примесей не связавшейся ДНК повторяли еще два раза. Отмытый осадок СПМЧ с иммобилизованной ДНК ресуспендировали в физиологическом растворе до конечного объёма 200 мкл.

Для определения острой токсичности суперпарамагнитных наночастиц Fe_3O_4 и нанокомплекса [ДНК+Fe_3O_4] использовали 100 белых мышей SHR обоего пола с массой 22–24 г. Животные были разделены на 10 групп и индивидуально промаркированы. В каждой группе было по 10 животных (5 самок и 5 самцов). Дозы нанокомплекса [ДНК+Fe_3O_4] и суперпарамагнитных наночастиц Fe_3O_4 были следующие: 2 ммоль/кг (464 мг/кг), 4 ммоль/кг (928 мг/кг), 6 ммоль/кг (1392 мг/кг), 8 ммоль/кг (1856 мг/кг), 10 ммоль/кг (2320 мг/кг). Препараты вводили мышам внутрибрюшинно в объеме 0,2 мл на 25 г массы животного. За животными наблюдали в течение 2 месяцев. Определяли средне-смертельные дозы (LD_{50}), а также LD_{16} и LD_{84}. При оценке результатов опыта по острой токсичности у мышей суперпарамагнитных наночастиц Fe_3O_4 и нанокомплекса [ДНК+Fe_3O_4] использовали метод наименьших квадратов для пробит-анализа кривых летальности по В.Б. Прозоровскому [3, 4].

Результаты и обсуждение. В результате проведенного исследования было обнаружено, что на протяжении 2 месяцев наблюдения за мышами SHR обоего пола при всех испытанных дозах как нанокомплекса [ДНК+Fe_3O_4], так и парамагнетика Fe_3O_4 не наблюдалось 100% гибели животных. Результаты обработки полученных данных по методу В.Б. Прозоровского представлены в таблицах.

На основании анализа полученных данных установлено, что, LD_{50} суперпарамагнитных наночастиц Fe_3O_4 у самок мышей SHR составляет 4362мг/кг (18,8 ммоль/кг), LD_{16} – 1090 мг/кг, LD_{84} – 9800 мг/кг.

Исходя из данных таблицы 2, LD_{50} суперпарамагнитных наночастиц Fe_3O_4 у самцов мышей SHR равно 7053 мг/кг (30 ммоль/кг), LD_{16} – 1299 мг/кг, LD_{84} – 23664 мг/кг.

Исходя из данных таблицы 3, у самок мышей SHR LD_{50} нанокомплекса [ДНК+Fe_3O_4] равно 2589 мг Fe_3O_4/кг (11,2 ммоль Fe/кг), LD_{16} – 1276 мг/кг, LD_{84} – 6454 мг/кг.

Исходя из данных таблицы 4, у мышей SHR самцов LD_{50} нанокомплекса [ДНК+Fe_3O_4] равно 2677 мг Fe_3O_4/кг (11,5 ммоль Fe/кг), LD_{16} – 1471 мг Fe_3O_4/кг, LD_{84} – 3881 мг Fe_3O_4/кг.

Гибель животных при внутрибрюшинном введении суперпарамагнитных наночастиц Fe_3O_4 происходила с 7-го по 52-й день после однократной инъекции, при введении нанокомплекса [ДНК+Fe_3O_4] мыши погибали с 7-го по 50-й день. На вскрытии погибших животных, получавших высокие дозы (2320 мг/кг) суперпарамагнитных наночастиц Fe_3O_4 или нанокомплекса [ДНК+Fe_3O_4], в брюшной полости обнаруживались конгломераты частиц Fe_3O_4, тогда как у мышей, погибших от меньших доз, наблюдали равномерное распределение частиц Fe_3O_4 по брюшине.

В литературе данные о токсичности микро- и наночастиц оксидов железа отрывочны. Так, в статье Nissim J.A. 1954 г., посвященной токсическим реакциям оксида железа при внутривенном введении человеку [6], LD_{50} для двух препаратов суспензии оксида железа в сахарозе для мышей составила 180 мг Fe на 1 кг и 300 мг Fe на 1 кг соответственно, то есть токсичность используемого препарата оксида железа была достаточно высокой. К сожалению, размеры частиц оксида железа в работе не указаны, упомянуто только, что использовали коллоидный препарат. Оценка острой токсичности препарата суперпарамагнитных наночастиц оксида железа, стабилизированных цитратом (препарат AMI-25, приготовленный для клинических исследований – контрастный агент для магнитного резонанса) показала отсутствие летального эффекта при самой высокой дозе 3 ммоля на 1 кг массы животного в течение 14 дней [7], к сожалению, перед авторами работы не стояла задача определения LD_{50}. Для другого стабилизированного препарата суперпарамагнитных наночастиц оксида железа (VSOP-C184) на мышах была определена величина LD_{50}, которая составила 17,9 ммоль Fe/кг, что превышает максимальную дозу, используемую для человека в 230 раз [8]. Приведенная величина LD_{50} 17,9 ммоль Fe/кг для VSOP-C184 очень близка к нашей величине 4362 мг/кг (18,8 ммоль Fe/кг) для суперпарамагнитных наночастиц Fe_3O_4. Интересно, что величина LD_{50} для препарата VSOP-C184 на крысах в два раза ниже, чем на мышах, и превышает максимальную дозу, используемую для человека, в 116 раз.

Нами впервые показана разная токсичность (LD_{50}) суперпарамагнитных наночастиц Fe_3O_4 для самцов и самок мышей – 30,0 и 18,8 ммоль Fe/кг соответственно, что свидетельствует о необходимости учитывать не только видовую, но и гендерную составляющую при экстраполяции оценки риска использования наночастиц, полученную на грызунах, на человека.

Заключение. В целом, на основании полученных результатов можно заключить, что созданные в РНЦРХТ суперпарамагнитные наночастицы Fe_3O_4 и нанокомплекс [ДНК+Fe_3O_4] умеренно токсичны или малотоксичны и могут быть использованы в дальнейших разработках для создания конструкта для генной терапии опухолей.

Таблица 1

Определение острой токсичности суперпарамагнитных наночастиц Fe_3O_4 у самок мышей SHR

Доза, мг/кг ХЭ	**Летальность, %** УЭ	**Место концентрации** Х	**Пробиты** У	**Весовой коэфф.** В	ХВ	X^2B	УВ	ХУВ
464	20	1	4,16	3,9	3,9	3,9	16,2	16,2
928	0	2	3,04	1,8	3,6	7,2	5,47	10,94
1392	60	4	5,25	4,7	18,8	75,2	24,67	98,68
1856	60	6	5,25	4,7	28,2	169,2	24,67	148,0
2320	20	8	4,16	3,9	31,2	24,96	16,2	129,6
				19	85,7	505,1	87,2	403,4

Таблица 2

Определение острой токсичности суперпарамагнитных наночастиц Fe_3O_4 у самцов мышей SHR

Доза, мг/кг ХЭ	**Летальность, %** УЭ	**Место концентрации** Х	**Пробиты** У	**Весовой коэфф.** В	ХВ	X^2B	УВ	ХУВ
464	0	1	3,04	1,8	1,8	1,8	5,47	5,47
928	40	2	4,75	4,75	9,5	19	22,56	45,1
1392	20	4	4,16	3,9	15,6	62,4	16,2	64,9
1856	40	6	4,75	4,75	28,5	171	22,56	135,4
2320	20	8	4,16	3,9	31,2	249,6	16,2	129,8
				19,1	86,6	503,8	83,0	380,7

Таблица 3

Определение острой токсичности нанокомплекса [ДНК+Fe_3O_4] у самок мышей SHR

Доза, мг/кг ХЭ	**Летальность, %** УЭ	**Место концентрации** Х	**Пробиты** У	**Весовой коэф.** В	ХВ	X^2B	УВ	ХУВ
464	80	1	5,84	3,9	3,9	3,9	22,8	22,8
928	40	2	4,75	4,75	9,5	19	22,6	45,2
1392	40	4	4,75	4,75	19	76	22,6	90,4
1856	20	6	4.16	3,9	23,4	140,4	16,2	97,2
2320	40	8	4,75	4,75	38	304	22,6	180,8
				22,05	93,8	543,3	106,8	436,4

Таблица 4

Определение острой токсичности нанокомплекса [ДНК+Fe_3O_4] у самцов мышей SHR

Доза, мг/кг ХЭ	**Летальность, %** УЭ	**Место концен-трации** Х	**Пробиты** У	**Весовой коэфф.** В	ХВ	X^2B	УВ	ХУВ
464	0	1	3,04	1,8	1,8	1,8	5,47	5,47
928	0	2	3,04	1,8	3,6	7,2	5.47	10,94
1392	40	4	4,75	4,75	19	76	22,56	90,24
1856	20	6	4,16	3,9	23,4	140,4	16,2	97,2
2320	40	8	4,75	4,75	38	304	22,56	180,48
				17	64,8	529,4	72,3	384,3

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Гершанович М.Л., Филов В.А., Акимов М.А., Акимов А.А.* Введение в фармакотерапию злокачественных опухолей. СПб.: Сотис, 1999.

2. *Радилов А.С., Глушкова А.В., Дулов С.А.* Экспериментальная оценка токсичности и опасности наноразмерных материалов // Нанотехнологии. Экология Производство. 2009. – № 1. – С. 86–89.

3. *Прозоровский В.Д.* Использование метода наименьших квадратов для пробит-анализа кривых летальности //Фармакология и токсикология, 1962. – Т. 25. – № 1. – С. 115–120.

4. *Прозоровский В.Д.* Практическое пособие по ускоренному определению средних эффективных доз и концентраций биологически активных веществ. Байкальск: Изд-во Общества духовной и психической культуры, 1994.

5. *Shaw S.Y., Westly E.C., Pittet M.J. et al*. Perturbational profiling of nanomaterial biologic activity // Proc. Natl. Acad. Sci. 2008. – Vol. – 105. № 21. – P. 7387–7392.

6. *Nissim J.A.* // Toxic reactions after intravenous saccharted iron oxide in man. British Medical Journal. 1954. Feb. 13. – P. 352–356.

7. *Weissleder R., Stark D.D., Engelstad B.L.et al.* // Superparamagnetic iron oxide: pharmacokinetics and toxicity Amer. J. Roentgenol. 1989. – Vol. 152. – P. 167–173.

8. Citrate-coated (184th variant) very small superparamagnetic iron oxide particles VSOP-C184. Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD) [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US). 2006. Sep 27.

S.F.Vershinina[1], A.N.Stukov[2], Ye.I.Yakubovich[1], R.B.Samsonov[1], D.M.Lavnikevich[1], V.I. Yevtushenko[1]

Experimental study of acute toxicity of supermagnetic Fe_3O_4 nanoparticles and nanocomplex [DNA+Fe_3O_4]

[1]Russian Scientific Center for Radiology and Surgical Technologies (RSCRST)
[2]N.N.Petrov Institute of Oncology, St.-Petersburg

In experiments on mice SHR, acute toxicity of Fe3O4-based nanoparticles and nanocomplex [DNA+Fe3O4] created at RSCRST was determined. Doses 2,4,6,8 and 10 mmol/kg were tested. Investigation results showed a low toxicity of the preparations. 100% death of animals was not observed for either dose. When testing paramagnetics Fe3O4 , a median lethal dose (LD50) was 18.8 mmol/kg for females and 30 mmol/kg for males. [DNA+Fe3O4] tested, LD50 was 11.2 mmol/kg for females and 11.5 mmol/kg for males.

Материалы поступили в редакцию 23.03.2012 г.

УДК 615.015.35

П.Ф. Забродский,
М. С. Громов,
И.Х. Яфарова

Саратовский филиал Самарского медицинского института «РЕАВИЗ»

Влияние хронической интоксикации ацетонитрилом на показатели системы иммунитета и содержание иммунорегуляторных, провоспалительных и антивоспалительных цитокинов в крови

В экспериментах на неинбредных белых крысах установлено, что после хронического действия ацетонитрила (30 суток, ежедневно подкожно 0,05 DL_{50}) в равной степени снижаются иммунные реакции, связанные с функцией Th1-, Th2- и В-лимфоцитов, уменьшается активность естественных клеток-киллеров, антителозависимая клеточная цитотоксичность, содержание в крови иммунорегуляторных, провоспалительных и антивоспалительных цитокинов (ИФН-γ, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-10 и ИЛ-13).

Ключевые слова*: ацетонитрил, Th1-, Th2-лимфоциты, иммунотоксичность, цитокины.*

Введение. Ацетонитрил (АН, нитрил уксусной кислоты, метилцианид, цианметан) – летучая, бесцветная, горючая жидкость с запахом эфира. АН широко используется в химической промышленности в органическом синтезе, производстве ароматических веществ, фармацевтических и парфюмерных препаратов, как селективный растворитель углеводородов, масел [3, 11]. АН является одним из самых распространенных лигандов в координационной химии [9]. Высокочистый ацетонитрил широко используется в высокоэффективной жидкостной хроматографии, газовой хроматографии и масс-спектрометрии как элюент [10].

В связи с возможной хронической интоксикацией АН в процессе его получения и работы с ним, при авариях на химических объектах и загрязнением местности могут формировать вторичные иммунодефицитные состояния [2, 3]. При этом изучение нарушений параметров системы иммунитета, в частности продукции цитокинов лимфоцитами и другими клетками крови, представляет как теоретический, так и практический интерес для профилактики и лечения возникающих в период и после хронического отравления АН различных инфекционных осложнений и заболеваний [1, 4]. Влияние хронической интоксикации АН на систему иммунитета не изучено [1, 2, 3, 4].

Целью исследования являлась оценка хронического действия АН в течение 30 суток на иммунные реакции, а также на содержание в крови иммунорегуляторных, провоспалительных и антивоспалительных цитокинов (γ-интерферона – ИФН-γ, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6 и ИЛ-10 и ИЛ-13).

Материал и методы исследования. Опыты проводили на нелинейных белых крысах обоего пола массой 180–240 г. АН вводили подкожно ежедневно в течение 30 суток в дозе 0,05 DL_{50} (суммарная доза 1,5 DL_{50}). DL_{50} АН для крыс при подкожном введении составляло 1750±95 мг/кг. Показатели системы иммунитета оценивали общепринятыми методами в экспериментальной иммунотоксикологии и иммунологии [3, 5] после хронической интоксикации АН через 30 суток после первой инъекции токсиканта. Гуморальную иммунную реакцию к тимусзависимому антигену (эритроцитам барана – ЭБ), характеризующую способность Th1-лимфоцитов участвовать в продукции плазматическими клетками IgM, определяли по числу антителообразующих клеток (АОК) в селезенке через 4 суток после иммунизации (пик продукции IgM), которую проводили внутрибрюшинно в дозе $2 \cdot 10^8$ на 26-е сутки после первого введения АН. Аналогично оценивали гуморальную иммунную реакцию к тимуснезависимому брюшнотифозному Vi-антигену (Vi-Ag), отражающую синтез IgM В-клетками (плазмоцитами) селезенки крыс. При этом проводили иммунизацию крыс Vi-Ag в дозе 8 мкг/кг. Функцию Th1-лимфоцитов оценивали также по реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ). Формирование ГЗТ исследовали у животных по приросту массы стопы задней лапы в процентах. Разрешающую дозу ЭБ ($5 \cdot 10^8$) вводили под апоневроз стопы задней лапы через 4 суток после иммунизации, которую проводили внутрибрюшинно на 26-е сутки после первого введения АН. Реакцию ГЗТ оценивали через 24 ч. Функцию Th2-лимфоцитов исследовали по числу АОК, синтезирующие IgG к ЭБ, в селезенке на пике продукции данного иммуноглобулина (на 14-е сутки после иммунизации) методом непрямого локального гемолиза в геле [5]. При этом крыс иммунизировали внутрибрюшинно ЭБ в дозе $2 \cdot 10^8$ клеток на 16-е сутки после первого введения АН.

Оценку активности естественных клеток-киллеров (ЕКК) и антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ), характеризующую функцию К-клеток, осуществляли спектрофотометрическим методом через 30 суток после первого введения АН [3]. При этом иммунизацию ЭБ (10^8 клеток) проводили за 4 суток до последнего введения АН (на 26-е сутки).

Концентрацию цитокинов иммунорегуляторных цитокинов (ИФН-γ, ИЛ-2, ИЛ-4), провоспалительного цитокина (ИЛ-6) и антивоспалительных цитокинов (ИЛ-10, ИЛ-13) [8] исследовали в плазме крови крыс через 30 суток после первой инъекции АН методом ферментного иммуносорбентного анализа (ELISA), используя наборы (ELISA Kits) фирмы BioSource Int. При этом ИФН-γ, ИЛ-2, ИЛ-6 и ИЛ-10 определяли через 4 суток после иммунизации ЭБ, а ИЛ-4 – на 14-е сутки (иммунизацию ЭБ проводили на 16-е сутки после первого введения АН).

Полученные данные обрабатывали статистически с использованием t-критерия достоверности Стьюдента.

Результаты и обсуждение. После хронической интоксикации АН через 30 суток показатели Т-зависимого – АОК к ЭБ (IgM), АОК к ЭБ (IgG) – и Т-независимого гуморального иммунного ответа – АОК к Vi-Ag (IgM) – снижались соответственно в 1,38; 1,39 и 1,42 раза ($p < 0,05$). Это свидетельствует о том, что АН при хроническом отравлении поражает Т-клетки и В-лимфоциты в равной степени.

Параметры клеточных иммунных реакций после воздействия АН в течение 30 суток – активность ЕКК, АЗКЦ, реакция ГЗТ – уменьшались соответственно в 1,40; 1,44 и 1,45 раза ($p < 0,05$). Полученные данные позволяют считать, что гуморальное и клеточное звенья иммунитета при хроническом воздействии АН поражаются практически одинаково.

После интоксикации АН происходит в равной степени как редукция функции Th1-клеток (АОК к ЭБ–IgM, реакция ГЗТ), так и Th2-лимфоцитов (АОК к ЭБ–IgG). Активность ЕКК и АЗКЦ в определенной степени зависит от функции Т-лимфоцитов (хелперов) первого типа (Th1). Снижение данных параметров, о чем свидетельствуют данные таблицы 1, приблизительно такое же, как и реакция, зависящая от Th2-клеток, а также гуморальный иммунный ответ, характеризующий активность В-лимфоцитов (АОК к Vi-Ag–IgM).

Таблица 1

Влияние хронической интоксикации ацетонитрилом (суммарная доза 1,5 DL_{50}, 30 сут) на показатели системы иммунитета белых крыс (M + m, n = 9–11)

Показатели	Контроль	АН
АОК к ЭБ (IgM), 10^3	40,5±4,1	29,4±2,9*
АОК к ЭБ (IgG), 10^3	56,7±5,5	40,8±4,3*
АОК к Vi-Ag (IgM), 10^3	29,8±3,1	21,0±2,3*
Активность ЕКК, %	27,9±2,9	20,0±2,1*
АЗКЦ, %	12,8±1,3	8,9±1,0*
ГЗТ, %	35,9±3,7	24,7±3,0*

*$p < 0,05$ по сравнению с контролем.

Под влиянием АН после хронической интоксикации в течение 30 суток (табл. 2) происходило снижение содержания в крови ИФН-γ, ИЛ-2, ИЛ-4 (иммунорегуляторные цитокины), ИЛ-6 (провоспалительный цитокин), ИЛ-10 и ИЛ-13 (антивоспалительные цитокины) в равной степени. Так, ИФН-γ, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-10 и ИЛ 13 уменьшались соответственно в 1,34; 1,33; 1,43; 1,51; 1,35 и 1,41 раза ($p < 0,05$). Следует отметить, что ИЛ-4 и ИЛ-6 могут выполнять и антивоспалительные функции [8].

Таблица 2

Влияние хронической интоксикации ацетонитрилом (суммарная доза 1,5 DL_{50}, 30 сут) на содержание цитокинов в крови белых крыс, пг/мл (M+m, n=8-10)

Цитокины	Контроль	АН
ИФН-γ	1016±85	760±80*
ИЛ-2	1245±110	933±94*
ИЛ-4	93±9	65±7*
ИФНγ/ИЛ-4	10,9±1,1	11,7±1,2
ИЛ-6	127±13	84±10
ИЛ-10	983±87	730±75*
ИЛ 13	110v12	78±8*

* $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

После хронического отравления АН установлено уменьшение концентрации ИФН-γ на 5-е сутки после иммунизации ЭБ в 1,34 раза ($p < 0,05$), а ИЛ-4 – на 14-е сутки после иммунизации ЭБ – в 1,43 раза ($p < 0,05$). При этом соотношение ИФНγ/ИЛ-4 в контроле составляло 10,9±1,1, а после действия АН – 11,7±1,2. Это свидетельствует о том, что концентрации ИФН-γ и ИЛ-4 в крови под влиянием АН снижаются в равной степени, следовательно, функция Th1- и Th2-лимфоцитов поражается одинаково [3, 6].

Полученные данные позволяют полагать, что одинаковое снижение активности Th1- и Th2-лимфоцитов в равной степени может приводить к развитию как микробной (основная защитная роль выполняется Th2-лимфоцитами и связанными с ними плазмоцитами, синтезирующими иммуноглобулины класса G за исключением IgM и IgG2a, продукция которых осуществляется при помощи Th1-лимфоцитов), так и вирусной инфекции (основная защитная роль наряду с другими Т-клетками, ЕКК и К-клетками принадлежит Th1-лимфоцитам) [3, 5, 7].

Уменьшение содержания в крови ИФН-γ (иммунорегуляторный цитокин) связано с поражением АН в основном Th1-лимфоцитов, а также ЕКК, К-клеток, осуществляющих АЗКЦ, цитотоксических Т-лимфоцитов [12]. Снижение в плазме крови после хронической интоксикации АН ИЛ-2 (иммунорегуляторного цитокина) свидетельствует о супрессии его продукции Т-клетками, в том числе и лимфоцитами Th0- и Th1-типа), снижении пролиферации Т- и В-клеток, активности ЕКК и АЗКЦ. Уменьшение в крови ИЛ-6 (провоспалительного интерлейкина и в определенных случаях антивоспалительного цитокина) характеризует редукцию его синтеза макрофагами и лимфоидными дендритными клетками вследствие их поражения АН и продуктами его метаболизма. Снижение в крови ИЛ-4 (иммунорегуляторного и в определенных случаях антивоспалительного цитокина) [8] обусловлено поражением АН преимущественно Th1-лимфоцитов [3, 5, 8].

Супрессия синтеза ИЛ-10 (антивоспалительного цитокина) под влиянием АН связана с поражением токсикантом Th0-, Th2-лимфоцитов, моноцитов, макрофагов и В-клеток [3, 5]. Уменьшение содержания в крови ИЛ-10 в такой же степени, как и ИФН-γ, подтверждает установленный нами равный поражающий эффект АН в отношении Th1- и Th2-лимфоцитов.

Снижение ИЛ-13 (антивоспалительного цитокина) обусловлено поражением АН в основном Th2-лимфоцитов, а также и других клеток крови. При этом может нарушаться модуляция данным цитокином аллергических реакций, а также апоптоза или роста опухолевых клеток [13].

АН метаболизируется, в основном, образуя цианид, за счет которого проявляется его иммунотоксическое действие вследствие ингибирования в клетках иммунной системы компонента тканевого дыхания a_3 цитохром-с-оксидазы, а также более 40 железо-, медь-, цинксодержащих ферментов. Кроме того, в процессе биотрансформации АН образуются роданиды, муравьиная кислота и аммиак, которые, за исключением роданидов, обладают выраженным иммунотоксическим действием [3].

Таким образом, хроническое действие АН (30 суток, суммарная доза 1,5 DL_{50}) в равной степени снижает Т-зависимый и Т-независимый гуморальный иммунный ответ, показатели клеточного звена иммунитета, функцию Th1- и Th2-лимфоцитов, содержание в крови иммунорегуляторных, провоспалительных и антивоспалительных цитокинов (ИФН-γ, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-13).

Выводы. 1. Хроническая интоксикация ацетонитрилом в течение 30 суток в суммарной дозе, составляющей 1,5 DL_{50}, в равной степени уменьшает активность Th1- и Th2-лимфоцитов, гуморальные и клеточные иммунные реакции.

2. После хронического отравления ацетонитрилом в равной степени снижается концентрация в крови иммунорегуляторных, провоспалительных и антивоспалительных цитокинов (ИФН-γ, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-13).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Забродский П.Ф.* // Эксперим. и клин. фармакол. 1999. – Т. 62. – № 3. – С. 48–49.
2. *Забродский П.Ф., Германчук В.Г.* // Токсикол. Вестник. 2000. – № 5. – С. 12–15.
3. *Забродский П.Ф., Мандыч В.Г.* Иммунотоксикология ксенобиотиков. Саратов, СВИБХБ, 2007. – 420 с.
4. Общая токсикология / Под ред. Б.А. Курляндского, В.А. Филова. М.: Медицина, 2002. – 608 с.
5. *Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д.* Иммунология. Пер. с англ. М.: Мир, 2000. – 582 с.
6. *Сухих Г.Т., Касабулатов Н.М., Ванько Л.В. и др.* // Бюлл. эксперим. биол. и мед. 2005. – Т. 140. – № 12. – С. 622–624.
7. *Asquith B., Zhang Y., Mosley A.J., de Lara C.M.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2007. – Vol. 104. – № 19. – P. 8035–8040.
8. *Becker K.L., Nylen E.S., White J.C. et al.* // J. Clin. Endocrinol. Metab. 2004. – Vol. 89. – №4. – P. 1512–1525.
9. *Bocian W., Sitkowski J., Bednarek E. et al.* // J. Biomol. NMR. 2008. – Vol. 40. – № 1. – P. 55–64.
10. *Ogawa S, Yoshimura E.*// J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 2012. – Vol. 909. – P. 34–36.
11. *Patil V.S., Nandre K.P., Ghosh S. et al.* // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2012. – Vol. 22. – № 23. – P. 7011–7014.
12. *Schoenborn J.R., Wilson C.B.* // Adv. Immunol. 2007. – Vol. 96. – P. 41–101.
13. *Wynn T.A.*// Annu. Rev. Immunol. 2003. Vol. 21. P. 425–456.

P.F. Zabrodskii, M.S. Gromov, I.Kh. Yafarova

The effect of chronic intoxication with acetonitrile on parameters of immunity and content of immunoregulatory, pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in blood

Saratov Branch, Samara Medical Institute «REAVIZ»

It was established in experiments on non-inbred rats that chronic intoxication with acetonitrile (30 days, daily subcutaneous 0.05 LD50) equally reduces immune responses associated with the function of Th1-, Th2-and B-lymphocytes, decreases activity of natural killer-cells, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity and reduces levels of immunoregulatory, pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines IFN-γ, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 and IL-13 in blood.

Материал поступил в редакцию 20.12.2012 г.

УДК. 614.7:612.394.2

Взвешенные вещества атмосферы и донозологические изменения у детей промышленного города

З.И. Намазбаева,
Л.Т. Базелюк,
А.Б. Ешмагамбетова, А.М. Пудов

Национальный центр гигиены труда и профзаболеваний Минздрава Республики Казахстан, г. Караганда

Получены результаты по накоплению химических элементов на фракциях пыли $PM_{2,5}$, PM_{10}. Установлено значительное превышение ПДК химических веществ в составе пыли по сравнению с концентрацией самой пыли. Получены результаты цитоморфологических исследований клеток слизистой оболочки полости носа и буккального эпителия щек у 108 детей дошкольного возраста и 89 детей школьного возраста, проживающих в промышленном городе, контрольная группа – 60 человек. Отмечено, что назальные и буккальные эпителиоциты обладают чувствительностью к различным экзогенным и эндогенным воздействиям экофакторов, что сказывается на функциональных изменениях этих клеток, где наблюдаются различные нарушения местного значения.

Ключевые слова: *дети, атмосферный воздух, взвешенные вещества, цитоморфологические исследования, клетки слизистой оболочки полости носа, буккальный эпителий щек.*

Введение. Атмосферный воздух является одним из ведущих объектов окружающей среды, с которым связана наибольшая часть всех рисков здоровью населения. Согласно эпидемиологическим исследованиям США и стран Европы смертность от сердечно-сосудистой и легочной патологии связывают с высокими концентрациями взвешенных веществ (TSP, $PM_{2,5}$, PM_{10}) в атмосфере. Именно такая токсичная городская пыль представляет наибольшую опасность при попадании в органы дыхания, так как быстро всасывается и оказывает раздражающее и общетоксическое действие, вызывая интоксикацию всего организма. Считают, что вредное воздействие TSP не имеет порога, ниже которого не наблюдалось бы нежелательных эффектов для здоровья человека [1–3]. Проникновение повышенных концентраций большого числа вредных

веществ через органы дыхания привело в наши дни к значительному изменению состояния здоровья населения и прежде всего детского возраста, где болезни органов дыхания занимают первое место в структуре общей заболеваемости. В последние годы доказана высокая информативность изучения эпителия слизистых оболочек полости носа (СОПН) и буккального эпителия щек (БЭЩ), которые обладают чувствительностью к различным экзогенным и эндогенным воздействиям, подвергаются функциональным изменениям при различных нарушениях локального и системного гомеостаза [4–8].

Целью исследования было изучение фракционного состава пыли с установлением концентрации химических веществ, входящих в состав взвешенных частиц, и определение значимости цитологических изменений в СОПН и БЭЩ у детей, проживающих в промышленном городе.

Материалы и методы исследования. Исследования проводились в промышленном городе Темиртау, расположенном в Центральной части Казахстана и представляющем собой типичный крупный промышленный регион с населением 176 тыс. человек, где расположены предприятия черной и цветной металлургии, энергетической, строительной промышленности, имеющие статус градообразующих. По количеству атмосферных выбросов на одного городского жителя приходится 2,1 тонны пылевых выпадений [9, 10].

Для определения содержания TSP и дисперсного анализа микроскопическим методом в 1-й зоне бралось по пять проб для анализа. Пробы отбирались на фильтре марки АФА-В с помощью аспиратора АПВ-4-12/220В-40. Среднесуточная проба отбиралась в течение 24 часов с равными интервалами, продолжительностью 60 мин, со скоростью 10 л/мин в течение 10 минут [11,12]. В качестве элюентов использовали 96%-ный этиловый спирт, изооктан, ацетон ацетонитрил. Для оценки плотности определяли удельный вес пыли с помощью седиментатора Грина пикнометрическим методом. Плотность твердой фазы (*Д*) рассчитывали по формуле $Д = B/A + B – C$, где *В* – навеска сухой пыли, *А* – масса пикнометра с водой, *ВС* – масса пикнометра с водой и пылью. Дисперсный состав взвешенных веществ определяли измеряя их размеры с помощью окумера сетки и объекта микрометра на микроскопе [13–16]. Цену деления окулярной сетки можно определить по формуле: $E = Z \times 0{,}01/L$, где *Z* – число делений шкалы объекта микрометра, 0,01 – цена делений объекта микрометра, *L* – число делений шкалы окуляра.

Использовался высокоэффективный жидкостной хроматограф LC-20 Prominсe фирмы Shimadzu (Япония) для точного определения низких концентраций различных веществ либо выявления примесей на фоне нескольких сопутствующих компонентов с близкими физико-химическими свойствами.

Дети детских садов, школ обследовались однократно с участием педиатра, невропатолога, хирурга, офтальмолога, лор-врача, психолога. Из всех осмотренных формировали группы, в которые включали лиц, соответствующих следующим критериям: дети дошкольного возраста (5–7 лет), подростки (14–16 лет), время проживания на территории населенного пункта со дня рождения.

Объем участников исследования определяли по формуле:

$n = t^2 * p * (1000 – p)^2$

На проведение исследований с участием детей было получено разрешение локальной этической комиссии. Для проведения обследования детей у родителей было получено индивидуальное письменное согласие-разрешение.

Для исследования городской пыли (TSP) в городе были выделены 3 зоны.

Зона 1 – относительно экологически чистая местность (удаленность от промышленного предприятия и автомагистралей около 7 км, контрольный район).

Зона 2 – крупная автомагистраль республиканского значения – 1000 метров.

Зона 3 – жилая зона около промышленного комплекса на расстоянии 1500 метров.

Нами были использованы методики цитологического анализа слизистой носа и щеки у организованных детей 5–7 лет – 108 человек и школьников 14–16 лет – 89 человек, проживающих на территории 2-й и 3-й зон около промышленного предприятия, а также 30 детей – 5–7 лет и 30 школьников 14–16 лет (1-я зона, контрольная группа). Все обследуемые дети без признаков респираторных заболеваний. Цитологические исследования проводились в весенние месяцы. Эти методики позволяют оценить состояние слизистой носа и щек как норму, воспаление, дистрофические изменения, кератинизация ядра, наличие патогенной микрофлоры и цитотоксическое действие факторов окружающей среды на слизистые эпителиоцитов. Соскобы со слизистой щек брали с помощью стерильного шпателя. Мазки высушивали на воздухе, затем окрашивали по методу Романовского-Гимза. При микроскопировании подсчитывали 300 клеток с каждого препарата. Контрольная группа обследованных детей была выбрана из 1-й зоны и была сопоставлена с цитологическими показателями других регионов Казахстана, относящихся к относительно экологически чистым районам и отработана в нашей лаборатории экологической биохимии и биофизики в качестве физиологических показателей [17].

Статистическая обработка полученных данных была проведена с помощью программы Statistica 5.5. Была проведена оценка данных на нормальность распределения по Колмогорову-Смирнову. Для медицинских данных с нормальным распределением рассчитано среднее арифметическое значение (M), ошибка среднего (m). Достоверность различий между полученными результатами и физиологическими показателями рассчитывалась с использованием непараметрического метода Манна-Уитни.

Результаты и обсуждение. Гигиеническая характеристика взвешенных частиц (TSP) промышленного города показала, что среднесуточная концентрация фракции $PM_{2,5}$ колебалась в пределах 0,2–0,5 мг/м^3 (ПДК$_{с.с.}$ – 0,05 мг/м^3), а фракции PM_{10} от 0,7 до 1,2 мг/м^3 (ПДК$_{с.с.}$ – 0,1 мг/м^3). Кроме того, соотношение между фракциями $PM_{2,5}$, PM_{10} и TSP было выше нормативных величин в среднем в 2 раза.

По данным таблицы 1 следует, что территория, расположенная в непосредственной близости от промышленного предприятия и автомагистрали, загрязнена органическими веществами. Превышение ПДК$_{с.с.}$ отмечено по содержанию сажи, минеральным маслам, ксилолу, фенолу и формальдегиду, кроме зоны 1.

Содержание тяжелых металлов в неорганической части пыли, определенное методом атомной абсорбции, в таблице 1 указывает на превышение ПДК$_{с.с.}$ по железу, свинцу, марганцу.

Таким образом, анализ гигиенических характеристик пыли (TSP) промышленного города показал, что городская пыль имеет сложный химический состав, содержащий токсичные вещества.

В СОПН у детей дошкольного возраста, проживающих во 2-й зоне г. Темиртау, обнаружено снижение количества нормального плоского эпителия в 25 раз, в 3-й зоне у детей встречались лишь единичные клетки, у подростков 2-й и 3-й зон выявлена аналогичная направленность изменений по сравнению с контрольной группой (1-я зона) (табл. 2). Необходимо отметить, что цитологические показатели контрольной группы и физиологические показатели равнозначны. Количество плоского эпителия с признаками повреждения повышено у детей, проживающих во 2-й зоне, в 15,6 раза, в 3-й зоне – в 4,9 раза, у подростков – в 28,2 раза и 26,4 раза соответственно. Количество кубического и цилиндрического эпителия у детей и подростков было снижено в 4,1 раза и 13,2 раза соответственно, а с признаками повреждения было повышено от 2,1 до 3,7 раза. Количество нейтрофильных лейкоцитов (НЛ) у детей 5–7 лет, проживающих во 2-й и 3-й зонах, было повышено от 9,4 до 15,4 раза, у подростков – в 7,2 раза (3-я зона), а с признаками повреждения (ДНЛ) (вакуолизированные и деструктивные) были повышены во всех возрастных группах 2-й и 3-й зон от 3,0 до 5,8 раза. Обсемененность микрофлорой (стрептококками и стафилококками) повышена у обследованных детей дошкольного возраста, проживающих во 2-й зоне, в 9,7 раза, у подростков – в 6,7 раза, в 3-й зоне обсемененность наблюдалась только у детей 5–7 лет и была повышена в 6,5 раза.

Полученные нами результаты показали, что у детей, проживающих в промышленных зонах г. Темиртау, в верхних дыхательных путях развиваются дистрофические процессы различной степени выраженности (табл. 2).

Параллельно были проведены цитологические исследования клеток БЭЩ у этих же детей. Так, у детей-дошкольников, проживающих во 2-й и 3-й зонах, отмечено снижение количества нормальных эпителиальных клеток на 30–37%, у подростков – на 94% и на 47% по сравнению с 1-й зоной. Наблюдается снижение количества фагоцитированных апоптозных (остаточных) тел только у детей 5–7 лет 2-й зоны в 4,4 раза (табл. 3). Содержание клеток с кариорексисом у всех возрастных групп подростков было повышено как во 2-й, так и в 3-й зоне от 4 до 10 раз. Количество безъядерных клеток в сторону повышения отмечено только у детей 5–7 лет во 2-й зоне в 4,3 раза. Содержание ДНЛ у детей и подростков 2-й и 3-й зон было повышено от 8,7 до 15,5 раза. Клетки с вакуольной дистрофией были повышены у подростков 2-й зоны в 12,2 раза и у лиц 3-й зоны в 5,9 раза по сравнению с контрольной зоной. Количество тучных клеток было повышено как у детей дошкольного возраста, так и у детей школьного возраста, во 2-й зоне – от 8 до 10,7 раза, в третьей зоне у детей 5–7 лет – в 7,3 раза, у школьников – в 3,9 раза. Повышенная обсемененность микрофлорой наблюдалась у всех возрастных групп промышленных зон – от 5,6 до 7,9 раза.

В результате проведенного корреляционного анализа у детей, проживающих в городе Темиртау, выявлено, что ряд факторов химической природы, обнаруженных в атмосферном воздухе, негативно влияют на состояние плоского эпителия слизистой носа жителей.

У подростков обнаружен положительный коэффициент корреляции между числом клеток в БЭЩ с кариорексисом и концентрацией в атмосферном воздухе в пыли взвешенных веществ и фенола (r = 0,82). Аналогичная корреляционная зависимость наблюдалась между фенолом в пыли и повышенным содержанием ДНЛ в БЭЩ у подростков (r = 0,80) и у детей дошкольников (r = 0,76), что проявлялось у обследованных лиц развитием хронических воспалительных процессов в БЭЩ. Выявлена корреляционная зависимость между количеством двухъядерных клеток и интегральным показателем загрязнения воздуха – ИЗА (r = 0,71), что приводит к повышенной пролиферации эпителиоцитов буккального эпителия щек.

Выводы: 1. Проведенный химический анализ пыли по фракциям показал превышение токсических элементов по приоритетности – сажа, ксилол, фенол, бенз(а)пирен, железо, свинец, кадмий, марганец.

2. Исследования цитологического статуса СОПН и БЭЩ у детей дошкольного и подросткового возраста позволили выявить нарушения барьерных свойств эпителиального пласта. Повышение фагоцитированных апоптозных (остаточных) тел в цитоплазме эпителиоцитов указывает на воздействие токсических факторов окружающей среды на организм детей, что подтверждено корреляционно-статистическими данными.

3. У детей дошкольного возраста и учащихся школ, проживающих в промышленном городе, в верхних дыхательных путях наблюдаются катаральные и атрофические риниты, поскольку слизистая оболочка носа является первым и важнейшим биологическим барьером на пути поступления в организм техногенных факторов химической природы.

4. Со стороны БЭЩ обнаружены нарушения репаративных процессов, что отражается на их способности к адгезивным взаимодействиям с микроорганизмами, постоянно находящимися в полости рта, что приводит к их накоплению и нарушению местного иммунитета.

5. Вследствие токсико-дисметаболических воздействий на организм возможно формирование патологических процессов, что требует дальнейшего углубленного изучения повреждающего воздействия химических факторов. Выявленные изменения цитоморфологических показателей позволяют рекомендовать неинвазивные анализы назального и буккального эпителия для оценки действия неблагоприятных факторов окружающей среды, особенно для выявления ингаляционного действия загрязнителей атмосферного воздуха. Преимуществом цитологических тестов является их неинвазивность и возможность использования в качестве скрининг-показателей.

Таблица 1

Кратность превышения (ПДК с.с.) химических веществ по фракциям пыли (PM_{10} $PM_{2,5}$) в атмосферном воздухе

Зоны	Минеральные масла	Сажа	Ксилол	Формальдегид	Фенол	Бенз(а)пирен	Fe	Pb	Cd	Mn	ИЗА
1	0,6	0,5	0,4	0,2	0,5	0,2	0,5	1,0	1,0	0,9	5
2	1,2	3,6	1,3	3,2	2,5	3,9	1,6	1,4	1,0	1,9	17
3	1,5	14,1	10,3	2,0	6,7	4,45	2,3	2,3	1,5	1,4	19

Таблица 2

Риноцитограмма (%) у обследованных детей г. Темиртау (n = 257, M ± m, 95% ДИ)

Тип клеток	1-я зона		2-я зона		3-я зона	
	дети (5–7 лет)	подростки (14–16 лет)	дети (5–7 лет)	подростки (14–16 лет)	дети (5–7 лет)	подростки (14–16 лет)
Плоский эпителий	40,0±3,4 (36–44)	40,1±2,4 (35–45)	1,57±0,58* (0,97–2,77)	1,14±0,45* (0,18–2,1)	0,21±0,1* (0,02-0,41)	1,08±0,28* (0,51–1,65)
Плоский эпителий с признаками повреждения	2,0±0,03 (0–2)	2,01±0,04 (0–2)	31,35±7,98* (14,71–48,0)	56,8±8,74* (38,3–75,2)	9,95±3,15* (3,36–16,53)	52,83±5,55* (41,60–64,0)
Кубические и цилиндрические эпителиальные клетки	45,0±4,2 (20–70)	46,0±5,0 (21–72)	4,3±1,08* (2,06–6,55)	4,08±2,02* (0,18–8,3)	10,95±2,98* (4,7–17,2)	3,41±1,13* (1,12-5,7)
Кубические и цилиндрические эпителиальные клетки с признаками повреждения	5,0±1,2 (0–10)	5,2±1,3 (0–10)	10,7±2,46* (5,61–15,91)	6,25±2,37* (1,24–11,3)	18,69±4,14* (10,04–27,3)	11,15±2,17* (6,75–15,5)
Сегменто- и палочкоядерные нейтрофилы	2,0±0,9 (0–4)	2,01±0,8 (0–4)	18,8±4,19* (10,08–27,6)	5,53±2,6 (0,2–11,03)	30,88±4,96* (20,52–41,2)	14,41±2,90* (8,54–20,29)
Сегменто- и палочкоядерные нейтрофилы с признаками повреждения	5,7±0,50 (2–9)	5,9±0,6 (2,1–9,1)	33,1±5,79* (21,06–45,2)	26,2±6,0* (12,86–39,46)	23,30±4,51* (19,89–38,7)	17,23±3,03* (11,1–23,36)
Эозинофилы	0,3±0,01 (0–1)	0,4±0,02 (0–2)	0,0±0,00	0,0±0.00	0,0±0,00	0,0±0,00
Обсемененность микрофлорой (стрептококки и стафилококки)	1,2±0,02 (0–2,4)	1,4±0,02 (0–2,6)	9,5±5,01* (0,92–20,0)	9,47±4,75* (0,54–19,5)	7,86±4,08* (0,65–16,33)	0,0±0,00

Примечание. *Достоверные данные по сравнению с первой зоной

Таблица 3

Буккальный эпителий щек (%) у обследованных детей г. Темиртау (n = 257, M ± m, 95% ДИ)

Тип клеток	1-я зона		2-я зона		3-я зона	
	дети (5–7 лет)	подростки (14–16 лет)	дети (5–7 лет)	подростки (14–16 лет)	дети (5–7 лет)	подростки (14–16 лет)
Нормальные эпителиальные клетки	85,00±4,25 (78–94)	86,00±4,3 (79–95)	62±4,5* (52,61–71,40)	43,6±5,5* (31,97–55,19)	65,14±3,76* (57,30–72,98)	57,76±3,61* (44,44–59,06)
Фагоцитированные апоптозные (остаточные) тела	2,00±0,70 (0–4)	2,04±0,80 (0–5)	0,45±0,30 (0,00–1,07)	3,72±2,44* (01,43–8,87)	0,45±0,17 (0,9–0,81)	1,84±1,23* (0,64–4,32)
Кариорексис	1,00±0,01 (0–2)	1,02±0,01 (0–3)	4,3±1,00 (2,24–6,42)	8,08±1,93* (4,02–12,14)	7,95±1,96* (5,46–10,45)	10,74±1,9* (6,73–14,75)
Безъядерные клетки	4,00±0,75 (1–7)	4,40±0,7 (1–7)	17,4±5,21* (6,60–23,3)	2,36±1,0 (0,24–4,48)	2,59±0,55* (1,43–3,75)	2,59±0,74* (1,09–4,10)
Дегенерированные нейтрофильные лейкоциты	1,00±0,25 (0–2)	1,30±0,3 (0–3)	12,7±2,90* (6,63–18,8)	12,1±5,24* (1,05–23,17)	15,52±3,18* (8,89–22,16)	11,32±2,8* (11,59–23,0)
Двухъядерные клетки	6,00±1,20 (0–12)	6,05±1,11 (0–13)	2,04±0,49 (1,03–3,07)	6,47±1,77* (2,73–10,2)	3,74±0,90* (1,86–5,62)	3,67±1,16* (1,31–6,02)
Клеточная вакуольная дистрофия	2,00±0,02 (0–4)	2,03±0,02 (0–4)	1,14±0,41 (0,28–2,00)	24,8±6,17* (11,79–37,81)	4,71±2,12* (0,31–9,16)	12,04±2,26* (7,46–16,16)
Тучные клетки	3,00±0,35 (0–6)	3,05±0,15 (0–6)	24,14±4,46* (14,83–33,5)	32,3±8,89* (13,54–51,07)	21,88±4,57* (12,35–31,4)	12,17±2,33* (7,45–16,88)
Обсемененность микрофлорой (стрептококки, стафилококки)	12,10±0,24 (5–19)	13,10±0,03 (5–19)	72,9±7,14* (58,01–87,8)	78,9±8,68* (60,63–97,62)	95,62±1,95* (91,55–99,6)	73,37±34,8* (62,39–84,36)

Примечание. *Достоверные данные по сравнению с первой зоной.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Awram N., Medrea N., Serdaru M.* Studies on the industrial pollution implication animal health and production in a massively metals polluted area // Stad. and Res. Vet. Med, 1995. – P. 137–146.

2. *Maddalone R.F.* Coal sorbent system for the extraction and disposal of heavy metals and organic compounds // Water. Air and soil Pollut., 1996. – № 1. – P. 163–171.

3. *Новиков С.М., Иваненко А.В., Волкова И.Ф., Корниенко А.П., Скворцова Н.С.* Оценка ущерба здоровью населения Москвы от воздействия взвешенных веществ в атмосферном воздухе // Гигиена и санитария. М., 2009. – № 6. – С. 41–43.

4. *Беляева Н.Н., Сычева Л.П., Журков В.С., Алтаева А.А., Пономарева О.Ю., Бударина О.В., Коваленко М.А.* Связь структурно-функциональных (гистологических и цитологических) показателей с цитогенетическими и цитотоксическими при оценке воздействия на организм // Гигиена и санитария, 2011. – № 5. – С. 48–50.

5. *Голдовская Л.Ф., Сальтевская Е.В.* Дисперсный состав аэрозольных частиц в районе предприятий стройиндустрии города Белгорода // Материалы II Международной открытой межвузовской научно-практической конференции «Региональные проблемы прикладной экологии». Белгород, 1998. – С. 20.

6. *Абаджи М.А., Махрова Т.В., Маянская И.В. и др.* // Нижегородский мед. журнал, 2003. – № 3–4. – С. 105–110.

7. Методические рекомендации «Методический подход в гигиенической оценке загрязнения атмосферного воздуха взвешенными веществами (TSP). – *Аманжол И.А., Намазбаева З.И., Пудов А.М., Мукашева М.А., Бенц Т.В., Облезина А.В., Сабиров Ж.Б., Агеев Д.В.* Караганда, 2012. – 30 с.

8. *Domachowske J.B., Bonville C.A., Rosenberg H.F.* // Respier Res., 2001. – Vol. 2. – P. 225 –228.

9. *Mattoli S.*// Environ. Hltt Perspect., 2001. – Vol. 109. – P. 553–557.

10. *Glushkova A.V., Radilov A.S., Dulov S.A.* Features of manifestation of toxicity of nanoparticles // Hygiene and sanitary, 2011. – № 2. – P. 81–86.

11. *Grigoriev Yu.I., Ershkov A.V., Silin I.I.* Quality of the air environment and incidence of children // Hygiene and sanitary, 2000. – № 4. – P. 28–31.

12. *Yanagita M., Shimabucuro Y., Nozaki T. et. al.* // Biochem. Biophys.Res. Commun., 2002. – Vol. 297. – P. 329–334.

13. *Гордиенко Н.Н., Михайленко Г.Г.* Исследование физико-химических свойств промышленных пылей. Одесса, 2001. – С. 12–16.

14. *Грин Х., Лейп В.* Аэрозоли – пыли, дымы, туманы. Л., 1969. – С. 128–320.

15. *Градус Л.Я.* Руководство по дисперсионному анализу методом микроскопии. М., 1979. – С. 163–180.

16. *Глебов И.Т.* Сопротивление тканевого фильтра аспирационной системы. Екатеринбург: 2001. – С. 2–4.

17. *Базелюк Л.Т., Намазбаева З.И., Аманжол И.А., Ешмагамбетова А.Б.* Оценка цитологического статуса верхних дыхательных путей // Методические рекомендации. Астана, 2012. – 34 с. (на русском и казахском языке).

Z.I.Namazbayeva, L.T. Bazelyuk, A.B. Eshmagambetova, A.M. Pudov

Suspended substances in the air and donozological changes in children in industrial towns

National Center for Hygiene and Occupational Diseases, Kazakhstan Ministry of Health, Karaganda

Results on accumulation of chemical elements in dust fractions PM 2,5, PM 10 were obtained. A significantly exceeded MAC value of chemicals in the dust composition compared to the concentration of the dust itself was established. Results were received of cytomorphological investigations of cells in the mucous membrane of the nasal cavity and in the cheek buccal epithelium in 108 children of preschool age and in 89 children of school age living n industrial towns, control group was of 60 people. It was noted that nasal and buccal epitheliocytes are sensitive to different exogenous and endogenic exposures of ecofactors which leads to functional changes in those cells where different local disturbances are observed.

Переработанный материал поступил в редакцию 02.04.2013 г.

УДК [630.886.1:615.9]:504.4.054:595.3

Н.Л. Корягина, Е.И. Савельева, Е.С. Уколова, А.И. Уколов, Н.С. Хлебникова, Н.Г. Войтенко, А.С. Радилов

ФГУП «НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека ФБМА России Ленинградская область, Вселожский район, г.п. Кузьмоловский

Хромато-масс-спектрометрическое исследование токсикологических профилей отравляющих веществ кожно-нарывного действия

Исследован профиль экскреции биомаркеров отравляющих веществ кожно-нарывного действия (ОВ КНД) после интоксикации крыс люизитом и иприто-люизитной смесью дозой 1,6 мг/кг. Проведена оценка возможности определения биомаркеров люизита в организме после проведения антидотной терапии унитиолом. Установлено, что экскреция 2-хлорвиниларсонистой кислоты (ХВАК) происходит гораздо активнее в первые двое суток после введения унитиола в сравнении с экскрецией в отсутствие антидотной терапии.

Показано, что наиболее значимым ретроспективным биомаркером при установлении факта воздействия иприто-люизитной смеси на организм является ХВАК, которая была достоверно идентифицирована в моче спустя 77 суток после экспозиции, в то время как метаболиты сернистого иприта (СИ) – тиодигликоль (ТДГ), тиодигликоль сульфоксида (ТДГО) – и β-лиазные метаболиты не определяются в рамках разработанных процедур уже через 7 суток.

Ключевые слова: *люизит, 2-хлорвиниларсонистая кислота, сернистый иприт, тиодигликоль, β-лиазные метаболиты, газовая хромато-масс-спектрометрия.*

Введение. Широкое внедрение методов хромато-масс-спектрометрии в практику химико-токсикологического анализа обеспечило аналитическую платформу не только для доказательного установления факта воздействия отравляющих веществ (ОВ) на организм, но и для системных метаболомических исследований, позволивших пересмотреть и дополнить представление о токсикологических профилях известных ОВ [1].

Сернистый иприт (СИ) и люизит относятся к ОВ КНД. СИ [бис(2-хлорэтил)сульфид] является наиболее известным ОВ КНД, и механизм его токсического действия достаточно хорошо изучен. Первичным продуктом гидролиза СИ является ТДГ, способный окисляться до ТДГО. Для ретроспективного анализа наиболее перспективными являются аддукты с белками: бис(N-ацетилцистеиновый) конъюгат сульфона СИ, N7-(2-гидроксиэтилтиоэтил)гуанин, β-лиазные метаболиты СИ: 1,1´-сульфонилбис[2-(метилсульфинил)этан] (СБМСЭ) и 1-метилсульфинил-2-[(метилтио)этилсульфонил]этан (МСМТЭСЭ). Процедуры определения биомаркеров СИ представлены в многочисленных публикациях [2–11].

В отличие от ряда других ОВ, люизит [дихлор(2-хлорвинил)арсин] в течение последних лет не являлся объектом внимания исследователей, несмотря на то, что тонны люизита и иприто-люизитных смесей находятся в неустановленных местах в качестве химического оружия (ХО), «оставленного» после Второй мировой войны. Люизит гидролизуется до 2-хлорвиниларсонистой кислоты (ХВАК), представляющей собой гидратную форму 2-хлорвиниларсиноксида, существующую только в водном растворе. Далее он может быть окислен до 2-хлорвиниларсоновой кислоты (ХВАОК). Указанные кислоты являются маркерами люизита. Обнаружение этих соединений в пробах однозначно указывает на факт контакта с люизитом. Авторы [12] полагают, что при отравлениях высокими дозами люизита ключевым биомаркером является ХВАОК, в то время как в случае малых доз в биопробах преимущественно обнаруживается ХВАК. Факторы, влияющие на состояние баланса ХВАК/ХВАОК в биопробах при отравлениях люизитом до настоящего времени исчерпывающим образом не изучены. Раздельное определение этих нелетучих соединений методом ГХ невозможно. В целях установления факта воздействия люизита на организм человека, совместное определение ХВАОК и ХВАК в биопробах, обработанных восстановителем, вполне допустимо, поскольку оба эти соединения являются маркерами люизита.

Способность люизита образовывать при взаимодействии с сульфгидрильными соединениями малотоксичные продукты была положена в основу разработки высокоэффективных антидотов. Первым в конце Второй мировой войны был предложен 2,3-димеркаптопропанол («британский антилюизит», БАЛ) [13]. Антидоты нового поколения – дитиоянтарная кислота и 2,3-димеркаптопропансульфонат натрия (унитиол) – обладают более высокой биодоступностью и меньшей токсичностью. Унитиол входит в набор средств первой помощи, применяемых в токсикологической реанимации, в частности, именно его обычно используют при острых отравлениях соединениями мышьяка [14–15]. В случае поражения люизитом или при наличии подозрения на такую возможность, вероятно, антидотная терапия будет проведена раньше, чем будут отобраны биопробы для анализа. Известно [17], что антидотная терапия поражений люизитом усиливает его экскрецию и перераспределение из тканей в кровоток, что не может не сказаться на результатах определения биомаркера люизита в биопробах. Считается, что унитиол реагирует с соединениями трехвалентного мышьяка с образованием комплексов, способных быстро выводиться из организма с мочой. Однако комплекс, образующийся при взаимодействии унитиола с люизитом или ХВАК, еще ни разу не был детектирован.

Следует отметить, что наиболее вероятен контакт человека и животных со смесью ОВ КНД, а не с каждым из ОВ отдельно. До настоящего времени не проводилось токсикологических экспериментов по экспонированию животных иприто-люизитными смесями с последующим определением биомаркеров воздействия в биопробах. Совместное определение продуктов превращения этих ОВ проводили в отношении объектов техногенного происхождения, в частности отходов от нейтрализации иприта с примесью люизита [18]. Люизит и продукты его разложения были обнаружены после дериватизации 1,3-пропандитиолом и экстракции гексаном производного с последующим ГХ-МС анализом. Среди продуктов гидролиза люизита преобладали оксиды. Анализ доступной литературы свидетельствует о том, что задача хромато-масс-спектрометрического определения биомаркеров люизита и СИ в биопробах при совместном воздействии этих ОВ КНД на организм решалась впервые.

Цель исследования – разработка процедур определения биомаркеров ОВ КНД: 2-хлорвиниларсонистой кислоты, тиодигликоля, тиодигликоль сульфоксида, β-лиазных метаболитов СИ в биопробах и их применение для исследования токсикологических профилей ОВ КНД, в том числе после проведения антидотной терапии.

Материал и методы исследования. Люизит (ГСО 8245-2003), оксид люизита (ГСО 8674-2005), сернистый иприт (ГСО 8248-2003), 1,3-пропандитиол (CAS 109-80-8, Aldrich Cat.:P5,060-9, Lot.:S40625-028), фениларсиноксид (ФАО) (CAS 637-03-6, Aldrich Cat.: 40,249-4, Lot.:71972-111), унитиол фармакопейный 5%-ный раствор в ампулах по 5 мл, диметилсульфоксид (ТУ 6-09-3818-88), тиодигликоль Aldrich, кат. № 16,678-2, тиодипропанол, Aldrich, кат.№ 20,534-6, ацетонитрил (ТУ 6-09-5497-91), метанол (ГОСТ 2222-95), ацетат натрия (ГОСТ 199-78), уксусная кислота (ГОСТ 19814-74), аскорбиновая кислота (ГОСТ 2184-77), цитрат натрия (ГОСТ 31227-2004), трихлорид титана (Aldrich, кат. №249998), гептафтормасляный ангидрид (Supelco, кат. № 33170-U), нафталин d_8 (ISOTEC 176044-1G).

Комплекс приспособлений для твердофазной микроэкстракции (ТФМЭ), включающий штатив, платформу для термостатирования и перемешивания, холдер для фиксирования микроволокон, Supelco, кат. № 57333-U.

Микроволокно для ТФМЭ с фазой полидиметилсилоксан (100um PDMS), Supelco, кат. №57300-U.

Картриджи для твердофазной экстракции (ТФЭ) OASIS HLB, 60мг фирмы Waters, кат. № WAT094226.

Растворы 2-хлорвиниларсиноксида готовили в 0,6%-ном водном растворе аскорбиновой кислоты.

Буферный раствор pH 4,5 готовили смешиванием 37 мл 0,2 М водного раствора ацетата натрия и 63,0 мл 0,2 М водного раствора уксусной кислоты.

В эксперименте были использованы 4 группы белых нелинейных крыс со средней массой тела 270±24г по 12 особей в каждой: 1-я группа животных получила люизит однократно подкожно в дозе 1,6 мг/кг, 2-я – через 30 мин после введения люизита получила однократно унитиол (70 мкл/100г в/м), 3-я – однократно подкожно раствор иприто-люизитной смеси (1:2) в дозе 1,6 мг/кг по люизиту, 4-ю группу составили контрольные животные, которым вводили раствор, содержащий все вспомогательные реагенты, за исключением ОВ и унитиола.

Раствор люизита предварительно готовили в диметилсульфоксиде (ДМСО) с концентрацией 10 мг/мл (5,3 мкл люизита, d_4^{25} 1,8793, вносили в 1,0 мл ДМСО), перед введением разбавляли дистиллированной водой до конечной концентрации 1,6 мг/мл. Раствор иприто-люизитной смеси (1:2) предварительно готовили в ДМСО с концентрацией 10 мг/мл (7 мкл люизита, d_4^{25} 1,8793, и 5 мкл сернистого иприта, d_4^{15} 1,280, вносили в 1,9 мл ДМСО), а перед введением разбавляли дистиллированной водой до конечной концентрации 1,6 мг/мл по люизиту. Животным вводили раствор из расчета 100 мкл на 100 г массы тела (средний объем 0,3 мл на крысу). В ходе эксперимента гибели подопытных животных не наблюдалось.

Контрольным крысам однократно под кожу вводили дистиллированную воду с добавлением ДМСО из расчета 100 мкл на 100 г массы тела. Животных содержали в стандартных условиях вивария со свободным доступом к воде и пище в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных или иных целей [19] и «Правилами лабораторной практики» (Приказ Минздравсоцразвития РФ» от 23 августа 2010 г. №708н).

Кровь получали под наркозом (уретан 1 г/кг) из сонной артерии. В качестве антикоагулянта использовали цитрат натрия (1 часть антикоагулянта на 9 частей крови). Цельную кровь центрифугировали при 2800 об/мин в течение 14 мин. После центрифугирования отбирали плазму крови, которую собирали от каждого животного отдельно, разливали в пробирки «эппендорф» и замораживали при –70°С. Оставшийся осадок эритроцитов однократно промывали физиологическим раствором и замораживали до проведения анализа. Сбор мочи в первую неделю после интоксикации проводили с водной нагрузкой 5 мл воды внутрибрюшинно. Начиная со второй недели, мочу собирали без водной нагрузки периодически. Общая продолжительность эксперимента составила 77 суток с момента интоксикации.

В качестве внутреннего стандарта при определении ХВАК использовали фениларси-

ноксид (ФАО). Навеску ФАО растворяли в небольшом количестве метанола и разводили ацетонитрилом до нужной концентрации.

В качестве внутреннего стандарта при определении ТДГ использовали тиодипропанол (ТДП). Растворы ТДГ и ТДП готовили в ацетонитриле. Определение ТДГ и ТДП в виде производных с гептафторомасляным ангидридом проводили методом ГХ-МС в режиме электронной ионизации.

В качестве внутреннего стандарта при определении β-лиазных метаболитов СИ использовали нафталин-d_8. Растворы определяемых веществ и внутреннего стандарта готовили в ацетонитриле. Определение β-лиазных метаболитов СИ проводили методом ГХ-МС после обработки пробы трихлоридом титана в кислой среде, в результате чего оба β-лиазных метаболита восстанавливались до 1,1'-сульфонилбис[2-(метилтио)этана].

Определение метаболитов ОВ КНД проводили методом ГХ-МС-ЭИ на хромато-масс-спектрометре QP 2010 (Shimadzu) с капиллярной колонкой с неподвижной фазой HP-5 или DB-5 (25 м х 0,2 мм х 0,32 мкм). Условия газохроматографического разделения: температура испарителя 250°С; ввод пробы без деления потока (1,0 мин); температурная программа: начальная температура колонки 90°С (1 мин), скорость подъема температуры 20°С/мин, конечная температура колонки 270°С, выдержка при конечной температуре 15 мин; газ-носитель гелий, расход газа-носителя через колонку 1 мм³/мин. Температура интерфейса и детектора 270 и 200 °С соответственно.

Масс-спектрометрический анализ производных ХВАК и ФАО проводили при следующих условиях: энергия ионизирующих электронов 70 эВ, температура ионного источника 200°С, режим мониторинга выбранных ионов (МВИ): массовые числа регистрируемых ионов для 2-(2-хлорвинил)-1,3,2-дитиоарсенана m/z 228, 229, для 2-(фенил)-1,3,2-дитиоарсенана – m/z 258, 259. Полуколичественную оценку проводили по ионам с m/z 228 и 258, ионы с m/z 229 и 259 использовали для подтверждения идентификации.

Съемку масс-хроматограмм при определении ТДГ и ТДП проводили в режиме МВИ по m/z 241, 300 для бис[2-(гептафторбутирилокси)этил]сульфида и m/z 328, 542 для бис[2-(-гептафторбутирилокси)пропил]сульфида. Полуколичественную оценку проводили по ионам с m/z 241 и 328, ионы с m/z 300 и 542 использовали для подтверждения идентификации.

Условия ГХ-МС анализа при определении β-лиазных метаболитов СИ: температура испарителя 250°С; ввод пробы без деления потока (1,0 мин); температурная программа: начальная температура колонки 90°С (1 мин), скорость подъема температуры 20°С/мин до 180°С, 10°С/мин до 240°С, выдержка при конечной температуре 20 мин; газ-носитель гелий, расход газа-носителя через колонку 1 мм³/мин. Температура интерфейса и детектора 270 и 200°С, соответственно. Съемку масс-хроматограмм при определении β-лиазных метаболита в виде 1,1'-сульфонилбис[2-(метилтио)этана] проводили в режиме МВИ по m/z 47, 75, 140 и по m/z 136 для нафталин-d_8. Полуколичественную оценку проводили по ионам с m/z 140 и 136, ионы с m/z 47, 78 использовали для подтверждения идентификации.

Экспериментальная часть.

Определение 2-хлорвиниларсонистой кислоты в моче.

В виалу вместимостью 4 см³, содержащую 1,5 см³ ацетатного буфера (pH 4,5), помещали 1 см³ образца мочи, 0,005 см³ ацетонитрильного раствора ФАО с концентрацией 0,004 мг/см³ в качестве внутреннего стандарта, 25 мкл ацетонитрильного раствора 1,3-пропандитиола (1:10). Виалу герметизировали завинчивающейся крышкой с прокладкой из фторопластовой ленты и выдерживали 20 мин. при 70°С при постоянном перемешивании пробы. Определение ХВАК в приготовленном образце проводили методом ТФМЭ с применением микроволокна 100 мкм ПДМС в режиме отбора пробы из равновесного пара. Микроволокно 5 мин кондиционировали в инжекторе хроматографа при температуре 280°С, помещали путем прокола фторопластовой прокладки в паровую фазу над образцом на 10 мин. Сорбцию аналитов проводили при постоянном перемешивании и температуре 70°С. Термодесорбцию уловленных соединений проводили в инжекторе хроматографа при указанных выше условиях ГХ-МС анализа.

Линейный диапазон разработанной процедуры от 0,1 до 20,0 нг/мл; уравнение линейной зависимости $y = 0{,}167x$ ($n = 3$); коэффициент корреляции $R^2 = 0{,}998$. Продолжительность анализа 1 ч.

Определение 2-хлорвиниларсонистой кислоты в плазме крови.

К 1 см³ плазмы крови добавляли 3 см³ ацетонитрила, пробу встряхивали и проводили центрифугирование в течение 15 мин при 12000 об/мин. Надосадочную жидкость концентрировали в токе азота досуха. Сухой остаток перерастворяли в 1,5 см³ буфера pH 4,5. Далее анализ проводили аналогично анализу мочи.

Линейный диапазон разработанной процедуры от 1,0 до 20,0 нг/мл; уравнение линейной зависимости $y = 0{,}0051x$ ($n = 3$); коэффициент корреляции $R^2 = 0{,}995$. Продолжительность анализа 3 ч.

Определение 2-хлорвиниларсонистой кислоты в эритроцитах.

Эритроцитарную массу, полученную после центрифугирования цельной крови, промывали однократно физиологическим раствором в соотношении $V_{эритр}:V_{физиол\ р\text{-}ра}$ как (1:1). К промытой физиологическим раствором эритроцитарной массе добавляли равный объем деионизованной воды, инкубировали 10 мин при +4°С для получения гемолизата. К 1 объему гемолизата добавляли 2 объема ледяного метанола (–20°С) и замораживали при –20°С. Через 3 ч пробу размораживали, декантацией сливали надосадочную жидкость. К осадку добавляли 2 объема ледяного ацетонитрила (–20°С) и замораживали при –20°С. Через 3 ч пробу размораживали, метанольный и ацетонитрильный экстракт объединяли и концентрировали в токе азота досуха. Сухой остаток перерастворяли в 1,5 см³ буфера pH 4,5. Далее анализ проводили аналогично анализу мочи.

Линейный диапазон разработанной процедуры от 10,0 до 200,0 нг/мл; уравнение линейной зависимости $y = 0{,}0112x$ ($n = 3$); коэффициент корреляции $R^2 = 0{,}995$. Продолжительность анализа 8 ч.

Определение метаболитов СИ в моче.

К пробе мочи объемом 1 мл, содержащей 0,02 см³ ацетонитрильного раствора ТДП с концентрацией 0,01 мг/см³, добавляли 0,7 мл солянокислого раствора хлорида титана (15%-ный раствор в 20–30%-ной соляной кислоте). Пробу термостатировали при 80°С в течение 1 ч с перемешиванием. Затем раствор нейтрализовали 10М водным раствором гидроксида натрия до pH 6. Полученный образец подвергали центрифугированию в течение 15 мин при 3000 g. Надосадочную жидкость аккуратно отбирали одноразовым медицинским шприцом вместимостью 5,0 мл и делили на 2 равные части. Одну часть использовали для определения β-лиазных метаболитов СИ, другую – для низкомолекулярных метаболитов СИ – ТДГ и ТДГО.

1. Определение β-лиазных метаболитов СИ.

Жидкостную экстракцию β-лиазных метаболитов СИ из надосадочной жидкости проводили последовательно ацетонитрилом (2х1мл) и диэтиловым эфиром (1мл) с высаливанием хлоридом натрия (добавка к образцу 1 г хлорида натрия). Объединенный ацетонитрильно-эфирный экстракт концентрировали в токе азота до 0,05 мл, добавляли 0,005 мл ацетонитрильного раствора нафталина-d_8 с концентрацией 100 мкг/мл и анализировали при указанных выше условиях ГХ-МС анализа.

2. Определение суммарно ТДГ и ТДГО.

Надосадочную жидкость пропускали через сорбент (1 капля/с). Сорбент Oasis HLB емкостью 60 мг предварительно кондиционировали 2 см³ ацетонитрила и 2 см³ дистиллированной воды. После пропускания пробы, сорбент промывали 1 см³ дистиллированной воды и сушили под слабым вакуумом в течение 5 мин. Элюирование целевых веществ проводили ацетонитрилом (2х1см³) в виалу объемом 5 см³ с коническим дном. Элюат упаривали досуха в роторном испарителе при 60°С. Осадок перерастворяли в 0,06 см³ смеси ацетонитрил ГФМА в соотношении 1:1. Образец инкубировали при 50°С в течение 30 мин. К охлажденному образцу добавляли 2,0 мл деионизованной воды, 1г хлорида натрия и экстрагировали дериват ТДГ в гептан. Гептановый экстракт концентрировали в токе азота до 0,05 мл и определяли ТДГ при указанных выше условиях ГХ-МС анализа.

При низких концентрациях определяемого вещества объем биопробы для анализа может быть увеличен до 10 мл. При этом должен быть пропорционально увеличен объем солянокислого раствора трихлорида титана, используемый при пробоподготовке. Для анализа больших объемов проб до 10 мл необходимо использовать картридж Oasis HLB с массой сорбента 500 мг.

Линейный диапазон разработанной процедуры для определения суммарно ТДГ и ТДГО от 1 до 400,0 нг/мл; уравнение линейной зависимости $y = 0{,}1317x$ ($n = 3$); коэффициент корреляции $R^2 = 0{,}996$. Продолжительность анализа 3 ч.

Результаты и обсуждение. Важной особенностью определяемых метаболитов ОВ КНД является их присутствие в организме в виде окислительно-восстановительной пары. При определении методом ГХ-МС в процессе предшествующей пробоподготовки все метаболиты переводятся в восстановленную форму. В этом случае состояние баланса ХВАК/ХВАОК; ТДГ/ТДГО; МСМТЭСЭ/СБМСЭ остается неизвестным. Данное обстоятельство не препятствует установлению факта воздействия ОВ КНД на организм, напротив – способствует ему, обеспечивая обнаружение биомаркера в пробе независимо от состояния окисления. Индивидуальное определение окисленных и восстановленных форм метаболитов ОВ КНД достигается методами жидкостной хромато-масс-спектрометрии [20]. Результаты такого определения важны для понимания механизмов воздействия ОВ КНД на организм и дальнейшего совершенствования средств и методов антидотной терапии.

Литературные данные по определению ХВАК в биопробах представлены в весьма ограниченном количестве публикаций [21–29]. Определение ХВАК в данных работах проводили методом ГХ-МС с электронной ионизацией после дериватизации вицинальными дитиолами (1,2-этандитиолом, 1,3-пропандитиолом или 1,2-димеркаптопропан-1-олом) в виде летучих циклических дисульфидов.

Авторы [30] определяли ХВАК путем дериватизации целевого вещества 1,3-пропандитиолом непосредственно в водной пробе (в том числе и моче) с последующим детектированием летучего циклического дисульфида в режиме МВИ методом ГХ-МС в сочетании с ТФМЭ. Предел обнаружения разработанной методики 7,4 пг/мл мочи. Ограничением предложенной методики является необходимость использования дорогостоящего автоматизированного дозирующего устройства. Также методика не была апробирована на образцах in vivo, что не позволяло вынести суждения о ее применимости к определению ХВАК в конъюгированной форме. В нашей лаборатории данная процедура была модифицирована и применена к анализу образцов мочи, полученных в разные сроки после введения лабораторным животным ОВ. Также данная процедура была адаптирована к анализу проб плазмы крови и эритроцитов [31].

Результаты определения ХВАК в биопробах лабораторных животных.

По описанным выше процедурам определения биомаркеров ОВ КНД были проанализированы образцы биопроб животных всех групп, задействованных в токсикологическом эксперименте. Разработанные методики позволили определить ХВАК методом ГХ-МС в моче крыс через 2,5 месяца, в плазме крови и эритроцитах – через 7 суток после введения люизита в дозе 1,6 мг/кг и иприто-люизитной смеси в дозе 1,6 мг/кг по люизиту.

На рисунке 1 в качестве примера представлена масс-хроматограмма, полученная после ГХ-МС-анализа образца мочи животных 1-й группы через 31 сутки после интоксикации. На рисунке 2 представлены диаграммы, иллюстрирующие изменение содержания ХВАК в моче экспонированных ОВ КНД животных. Для наглядности начальная фаза экскреции (первые сутки) представлена на диаграмме *а*, а весь последующий период (до 77 суток) – на диаграмме *б*, поскольку содержание ХВАК в моче в первые сутки после интоксикации на несколько порядков выше, чем в последующие дни исследования.

Профили экскреции ХВАК в случае антидотной терапии унитиолом и в ее отсутствие существенно различаются в первые сутки после введения унитиола (рис. 2а). Максимальная концентрация ~30 мкг/мл ХВАК в исследованных образцах мочи зафиксирована через 3–6 ч после интоксикации и последующего лечения унитиолом. Без введения унитиола ориентировочное содержание ХВАК в моче животных 1-й и 3-й групп в период 3–6 ч составляет ориентировочно 2,5 и 5,0 мкг/мл соответственно. Через 24 ч после интоксикации содержание ХВАК в моче животных, получивших унитиол, как минимум в 5 раз выше в сравнении с образцами мочи, полученными от животных 1 и 3 групп. Содержание ХВАК в моче животных 3-й группы в первые 10 дней после экспозиции ОВ выше примерно в 2 раза. И это при том, что дозы люизита как такового и люизита в составе смеси с ипритом (2:1) были одинаковыми. СИ и люизит реализуют различные механизмы воздействия на организм, но первичные мишени воздействия для них одни и те же. Это сульфгидрильные группы. Активные сайты воздействия частично блокированы ипритом, поэтому люизит (ХВАК) в меньшей степени конъюгирован с биомолекулами, активно перераспределяется в кровоток и выводится с мочой. Более активному выведению может способствовать и образование комплексов люизита (ХВАК) с продуктом гидролиза СИ – ТДГ. Начиная с 48 ч после отравления значимых отличий, с учетом введенной дозы и типа ОВ, в содержании ХВАК в образцах, полученных от животных всех групп, не обнаружено.

На рисунках 3 и 4 представлены диаграммы, иллюстрирующие изменение содержания ХВАК в плазме крови и эритроцитах животных исследованных групп.

Экспериментально установлено, что содержание метаболита люизита в плазме крови и эритроцитах животных всех групп через 48 ч составило ориентировочно 10 и 150 нг/мл соответственно. Через 7 суток после отравления в плазме крови животных 1-й и 2-й групп содержание ХВАК зафиксировано на пределе обнаружения методики ~1 нг/мл, 3-й группы – 3 нг/мл. Следует отметить, что в эритроцитах крыс 1-й и 3-й групп, не получавших унитиол, снижение содержания ХВАК через 7 суток не обнаружено. Полученные данные согласуются с результатами, представленными в работе [32]. Авторы [32] определяли ХВАК методом ГХ-МС в виде производного с БАЛ и гептафторбутирилимидазолом в моче и цельной крови морских свинок после интоксикации люизитом дозой 0,25 мг/кг. В образцах мочи ХВАК была обнаружена в первые 12 ч после экспозиции, в цельной крови – спустя 10 дней. Проведенные исследования на образцах крови, in vitro экспонированной люизитом [^{14}C] (20нМ-0,2мМ), показали, что более 90% радиоактивной метки обнаруживалось в эритроцитах, причем 25–50% было связано с глобином.

На рисунке 5 представлена масс-хроматограмма, полученная после ГХ-МС - анализа образца мочи животных 3-й группы через 6 суток после интоксикации. На рисунке 6 представлены результаты исследования образцов мочи животных 3-й группы на содержание метаболитов СИ – суммарно ТДГ и ТДГО и β-лиазных метаболитов СИ.

Таким образом, анализ проб мочи животных 3-й группы показал, что при подкожном введении крысам иприто-люизитной смеси (1:2) в дозе 1,6 мг/кг по люизиту концентрация ТДГ в моче составила от 3 мкг/см³ до 10 нг/см³. При этом максимальная концентрация ТДГ была отмечена через 6 часов после интоксикации. Концентрации ТДГ в моче животных контрольной группы не превышали 1–3 нг/мл. Повышенные концентрации ТДГ в моче фиксировались в течение 7 дней после интоксикации. Содержание β-лиазных метаболитов СИ в моче животных 3-й группы в первые сутки после отравления было на уровне 100 нг/мл и оставалось на уровне

10 нг/мл в течение 7 суток.

Следует отметить, что низкомолекулярные продукты гидролиза СИ (ТДГ и ТДГО) являются соединениями биогенными. ТДГ может присутствовать в лакокрасочных покрытиях, полимерных и фотографических материалах, чернилах и, в низких концентрациях, в моче и плазме крови человека или животных. В рамках настоящих исследований было проведено определение ТДГ в моче 10 добровольцев разного возраста и разной половой принадлежности. Содержание ТДГ у разных людей варьировало от 1 до 14 нг/мл. Фоновые содержания ТДГ в моче на уровне 1–12 нг/мл были зафиксированы и в более ранних исследованиях [33, 34]. С учетом того, что в 24% случаев концентрации ТДГ в моче экспонированных СИ людей не превышали 25 нг/мл, ни ТДГ, ни ТДГО на уровнях 1–10 нг/мл не могут рассматриваться в качестве доказательных маркеров воздействия СИ или иприто-люизитных смесей на организм человека и могут быть использованы в таком качестве только при детектировании значительно более высоких концентраций (согласно [35], выше 100 нг/мл).

β-Лиазные метаболиты являются доказательными маркерами экспозиции СИ в связи с их отсутствием в моче неэкспонированных людей, и их обнаружение на любом уровне (вплоть до 0,1–0,3 нг/мл) убедительно доказывает факт экспозиции. В то же время, как отмечают исследователи [36], β-лиазные метаболиты детектируются в организме в течение более короткого времени. Так, в моче, отобранной через 2–3 дня у двух человек, подвергшихся случайному воздействию СИ из снарядов времен Первой мировой войны, были обнаружены сопоставимые концентрации ТДГ (52–80 нг/мл) и β-лиазных метаболитов (42–57 нг/мл). В то же время при ретроспективном исследовании мочи, отобранной через 13 дней после экспозиции, концентрация β-лиазных метаболитов составила 0,1–5 нг/мл, в то время как концентрации ТДГ все еще оставались достаточно высокими (11–72 нг/мл). Таким образом, для наиболее полной характеристики экспозиции СИ по результатам анализа мочи необходим анализ метаболитов, образующихся по обеим ветвям токсикологического профиля.

Заключение. В рамках проведенного токсикологического эксперимента показано, что максимальные уровни метаболитов ОВ КНД обнаруживаются в моче и эритроцитах. Показано, что в составе иприто-люизитной смеси, как и в случае применения унитиола, люизит (ХВАК) более активно перераспределяется из тканей в кровоток и выводится с мочой в первые сутки после воздействия. Таким образом, влияние антидотной терапии, как и конкурирующего агента, радикально меняет токсикологический профиль люизита. Проведение антидотной терапии унитиолом существенно активизирует экскрецию ХВАК в первые сутки после введения антидота. Антидотная терапия повышает возможность обнаружения ХВАК в моче в течение двух суток после введения унитиола. При этом возможность обнаружения биомаркера люизита в моче сохраняется даже в отдаленные сроки после воздействия.

Предложен алгоритм, позволяющий установить факт воздействия иприто-люизитной смеси на организм. При этом в биожидкостях, полученных в опыте in vivo после введения крысам иприто-люизитной смеси (1:2) в дозе 1,6 мг/кг по люизиту, определены как тиодигликоль и β-лиазные метаболиты сернистого иприта, так и метаболит люизита – 2-хлорвиниларсонистая кислота. Установлено, что наилучшим ретроспективным биомаркером является 2-хлорвиниларсонистая кислота, которая была достоверно идентифицирована в моче спустя 77 суток после экспозиции, в то время как метаболиты сернистого иприта не определяются в рамках разработанных процедур уже через 7 суток.

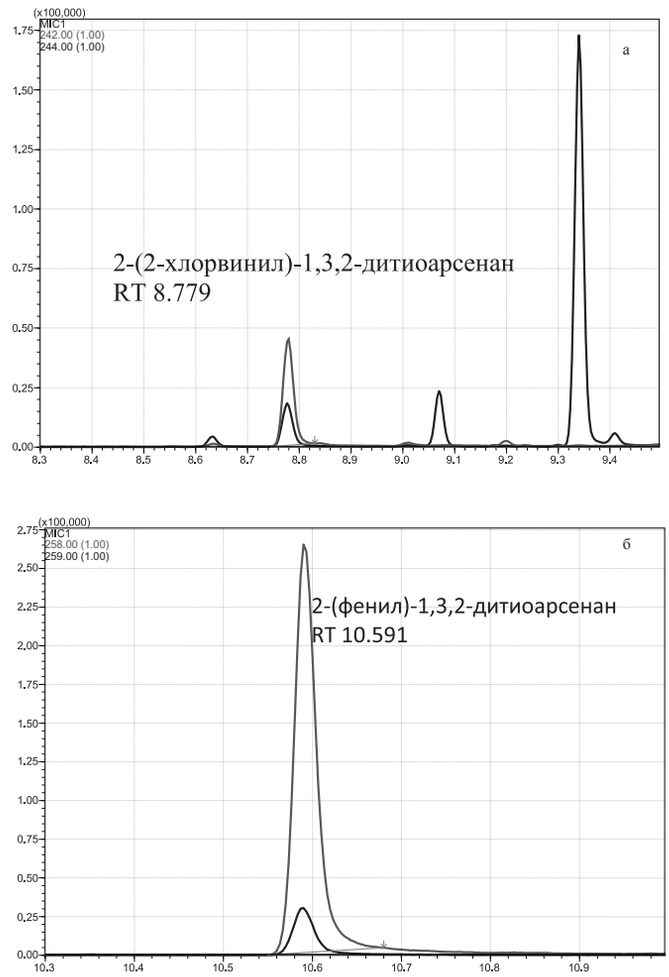
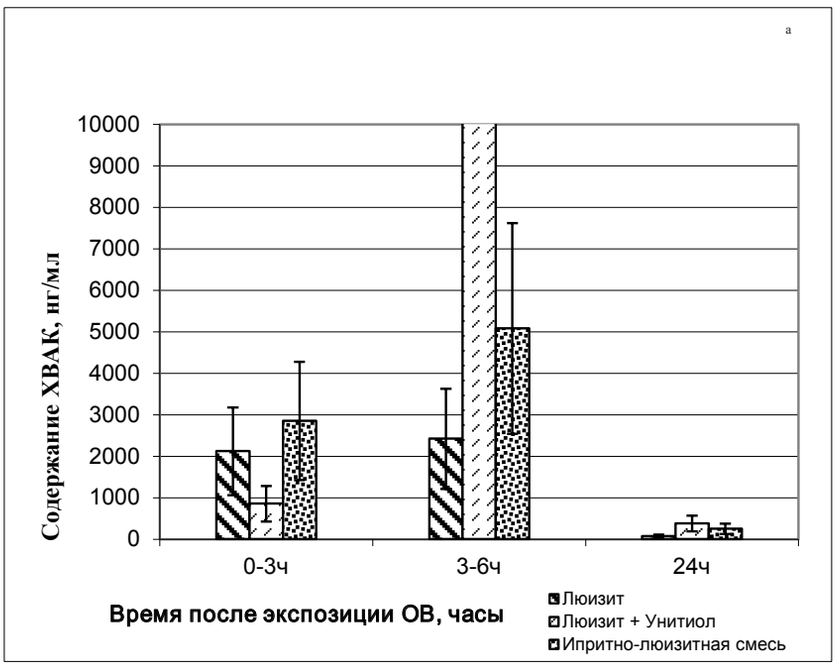


Рис. 1. Масс-хроматограмма, полученная после ГХ-МС - анализа образца мочи животных 1-й группы через 31 сутки после интоксикации: *а* – 2-(2-хлорвинил)-1,3,2-дитиоарсенана, *б* – пик внутреннего стандарта 2-(фенил)-1,3,2-дитиоарсенана



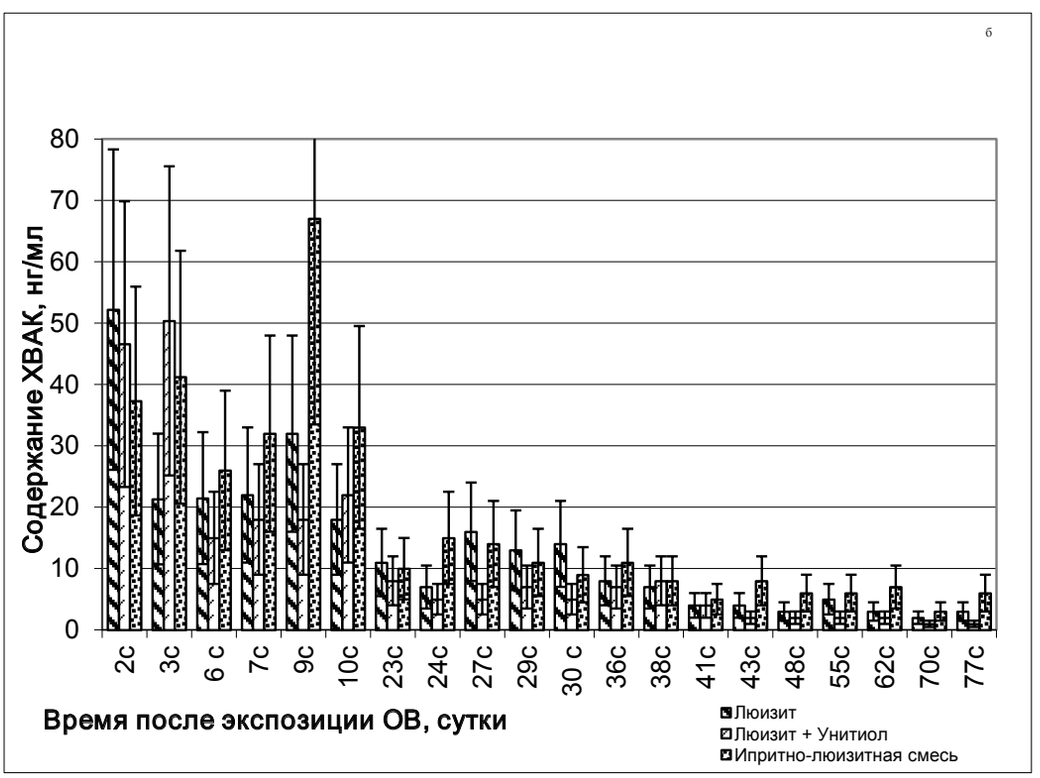


Рис. 2. Диаграммы, иллюстрирующие изменение содержания ХВАК в моче животных 1, 2 и 3 групп: *а* – изменение содержания ХВАК в первые сутки после интоксикации; *б* – изменение содержания ХВАК со 2-х по 77-е сутки

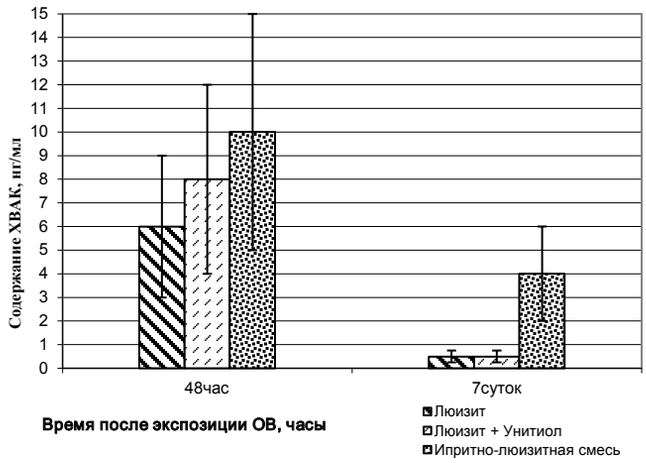


Рис. 3- Диаграмма, иллюстрирующая изменение содержания ХВАК в плазме крови животных 1, 2 и 3 групп

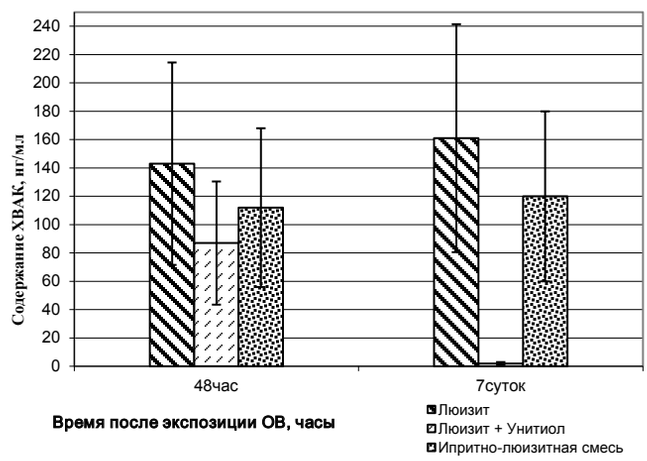


Рис. 4. Диаграмма, иллюстрирующая изменение содержания ХВАК в эритроцитах животных 1-й, 2-й и 3-й групп

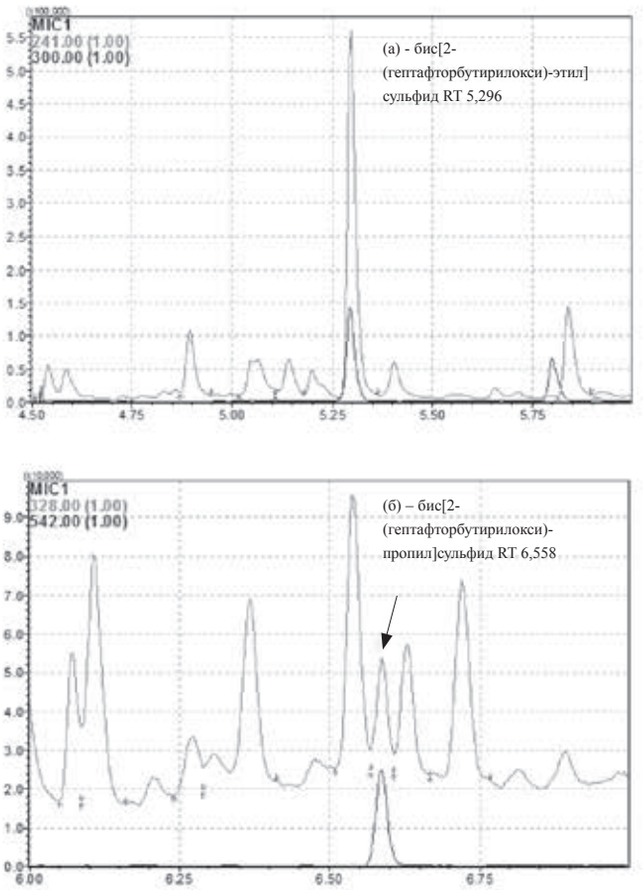


Рис. 5. Масс-хроматограмма, полученная после ГХ-МС-анализа образца мочи животных 3-й группы через 6 суток после интоксикации: *а* – бис[2-(гептафторбутирилокси)этил]сульфид, *б* – бис[2-(гептафторбутирилокси)пропил] сульфид (внутренний стандарт)

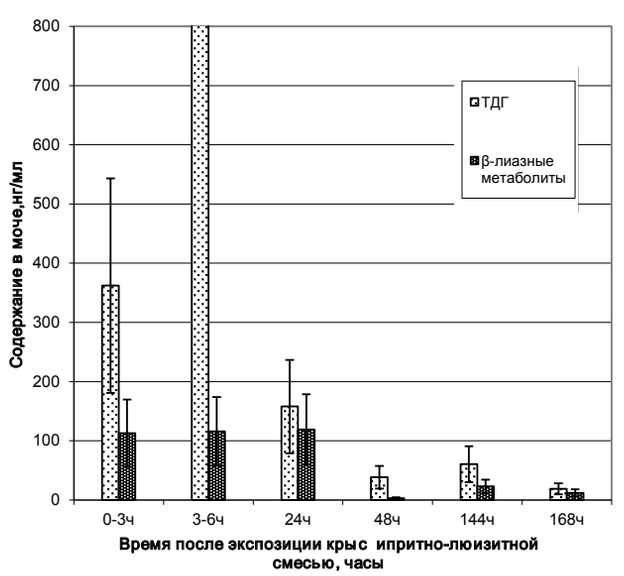


Рис. 6. Изменение содержания ТДГ и β-лиазных метаболитов СИ в моче животных 3-й группы

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Орлова О.И., Савельева Е.И., Хлебникова Н.С.* Методы обнаружения метаболитов сернистого иприта в объектах биологического происхождения. Аналитический обзор // Журнал аналитической химии, 2013. Т. 68. – № 1. – С. 4–14.

2. *Jakubowski E.M., Woodard C.L., Mershon M.M., Dolzine T.W.* Quantification of thiodiglycol in urine by electron ionization gas chromatography-mass spectrometry // J. Chromatogr., 1990. – Vol. 528. – P. 184–190.

3. *Black R.M., Read R.W.* Methods for the analysis of thiodiglycol sulfoxide, a metabolite of sulfur mustard, in urine by gas chromatography-mass spectrometry // J. Chromatogr., 1991. – Vol. 558. – P. 393–404.

4. *Hambrook J.L., Harrison J.M., Hqwells D.J. and Schoc C.* Biologicfl fate of sulfur mustard (1,1 -Thiobis(2-chloroethane): urinary and faecal excretion of 35S by rat after injection or cutaneous application of 35S-labelled sulfur mustard. Xenobiotica. – 1992. – Vol. 22. – P. 65–75.

5. *Hambrook J.L., Howells D.J. and Schock C.*, Biologicfl fate of sulfur mustard (1,1-thiobis(2-chloroethane)): uptake, distribution and retention of 35S in skin and in blood after cutaneous application of 35S-sulfur mustard in rat and comparison with human blood in vitro. Xenobiotica. – 1993. – Vol. 23. – P. 537–561.

6. *Noort D., Benschtop H.P. and Black R.M.* Biomonitoring of exposure to chemical warfare agents: a review // Toxicol.Appl. Pharmacol. – 2002. – Vol. 184. – P. 116–126.

7. *Black R.M., Hambrook J.L, Howells D.J. and Read R.W.* Biologicfl fate of sulfur mustard, 1,1`-Thiobis(2-chloroethane). Urinary excretion profiles of hydrolysis products and ß-lyase metabolites of sulfur mustard after cutaneous application in rats // J. Anal. Toxicol. – 1992. – Vol. 16. – P. 79–84.

8. *Riches J., Read R., Black R.M.* Analysis of the sulphur mustard metabolites thiodiglycol and thiodiglycol sulphoxide in urine using isotope-dilution gas chromatography-ion trap tandem mass spectrometry // J. Chromatogr. B. – 2007. – Vol. 845. – P. 114–120.

9. *Robin M. Black a; Robert W.* Read, Environmental and biomedical sample analysis in support of allegations of use of chemical warfare agents // Toxin Reviews. July. – 2007. – Vol. 26. Issue 3. – P. 275–298.

10. *Brian A. Logue et al.* Solid-Phase Microextraction Gas-Chromatography Mass-Spectrometry of Sulfur Mustard Metabolites in Hair. SDSU. PITTCON 2006. March 12–17. 2006. Orlando. Florida.

11. *Koyama J., Matsumoto T., Ohtsu Y. and Nakata O.* Determination of thioglycolic acid, dithiodiglycolic acid, cysteine and cystine in hair-waving solutions by HPLC. Bunseki Kagaku. – 1988. – Vol. 37. – P. 142–146. (http://www.springerlink.com/content/uu531p7844723251/fulltext.pdf).

12. *Stanelle R., McShane W., Dodova E., Pappas R.* Rapid analysis of Lewisite metabolites in urine by high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry // J. Anal Toxicol. – 2010. – Vol. 34. – № 3. – P. 122–128.

13. *Vilensky J.A., Redman K.* British anti-Lewisite (Dimercaprol): an amazing history //Ann. Emerg. Med. – 2003. – Vol. 41. – P. 378–383.

14. *Aposhian H. V.* DMSA and DMPSswater soluble antidotes for heavy metal poisoning // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. – 1983. – Vol. 23. – P. 193–215.

15. *Aposhian H. V., Carter D. E., Hoover T. D., Hsu C. A., Maiorino R. M., Stine E.* DMSA, DMPS, and DMPAsas arsenic antidotes // Fundam. Appl. Toxicol. – 1984. – Vol.4. – P. S58–S70.

16. *Aposhian H. V., Maiorino R. M., Gonzalez-Ramirez D., Zuniga-Charles M., Xu Z., Hurlbut K. M., Junco-Munoz P., Dart R.C., Aposhian M. M.* Mobilization of heavy metals by newer, therapeutically useful chelating agents // Toxicology. – 1995. – Vol. 97. – P. 23–38.

17. *Gong Z., Jiang G., Cullen W.R., Vasken Aposhian H., Le X.* Determination of Arsenic Metabolic Complex Excreted in Human Urine after Administration of Sodium 2,3-Dimercapto-1-propane Sulfonate // Chem. Res. Toxicol. – 2002. – Vol. 15. – P. 1318–1323.

18. *Creasy W.R. et al* // Environ. Sci. Technol. – 1999. – Vol. 33. – P. 2157–2162.

19. Европейская конвенция по защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях. Страсбург. – 1986. – ETS №123.

20. *Read R.W. and Black R.M.* Analysis of b-lyase metabolites of sulfur mustard in urine by electrospray liquid chromatography-tandem mass spectrometry // J. Anal. Toxicol. 28. – 2004. – P. 346–351.

21. *Logan T., Smith J., Jakubowski E., Nielson R.* Verification of lewisite exposure by the analysis of 2-chlorovinyl arsonous acid in urine // Toxicol Meth. – 1999. – Vol. 9. – P. 275–284.

22. *Wooten J., Ashley D., Calafat A.* Quantitation of 2-chlorovinylarsonous acid in human urine by automated solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry // J. Chromatogr. B. Anal. Technol. Biomed Life Sci. – 2002. – Vol. 772. – P. 147–153.

23. *Fidder A., Noort D., Hulst et al.* Biomonitoring of exposure to lewisite based on adducts to haemoglobin // Arch. Toxicol. – 2000. – Vol. 74. – P. 207–214.

24. *Smith J., Logan T., Szafraniec L., Jakubowski EM.* Spectroscopic characterization of the geminal isomer of Lewisite // Anal Lett. – 1995. – Vol. 28. – P. 1541–1554.

25. *Waters W., Williams J.* Hydrolyses and derivatives of some vesicant arsenicals // J. Chem Soc. – 1950. – P. 18–22.

26. *Jakubowski E., Smith J., Logan T.* Verification of Lewisite exposure: quantification of chlorovinylarsonous acid in biological samples // Proceedings of the 1993 Medical Defense Bioscience Review. Aberdeen Proving Ground, Md: US Army Medical Research Institute of Chemical Defense. – 1993. AD A275667.

27. *Shirley D.* Tuorinsky (senior editor) Medical Aspects of Chemical Warfare, Chapter 22 Medical Diagnostics // Library of Congress. Washington. DC 20307–5001. – 1997. – P. 728–731.

28. *Stanelle R., McShane W., Dodova E., Pappas R.* Rapid analysis of Lewisite metabolites in urine by high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry // J. Anal Toxicol. – 2010. – Vol. 34. – № 3. – P. 122–128.

29. *Gong Z., Jiang G., Cullen W.* Determination of arsenic metabolic complex excreted in human urine after administration of sodium 2,3-dimercapto-1-propane sulfonate // Chem Res Toxicol. – 2002. – Vol. 15. – P. 1318–1323.

30. *Wooten J., Ashley D., Calafat A.* Quantitation of 2-chlorovinylarsonous acid in human urine by automated solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry // J. Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. – 2002. – Vol. 772. – P. 147–153.

31. *N.L.Koryagina, E.S. Ukolova, E.I. Savel'eva, N.G. Voitenko, O.I. Orlova, R.O. Jenkins, N.V. Goncharov.* High-Sensitivity Determination of 2-Chlorovinylarsonous Acid in Biomedical Samples for Retrospective Detection of Exposure to Lewisite Upon Antidotal Therapy // Spectroscopy. – 2011.– Vol. 26. – № 1. – P. 1–10.

32. *Fidder A., Noort D., Hulst et al.* Biomonitoring of exposure to lewisite based on adducts to haemoglobin // Arch. Toxicol. – 2000. – Vol. 74 – P. 207–214.

33. *Wils E.R.J., Hulst A.G., de Jong A.L., et al.* Analysis of thiodiglycol in urine of victims of an alleged attack with mustard gas // J. Anal. Toxicol. 1985. V. 9. P. 254-257.

34. *Wils E.R.J., Hulst A.G., A. G. van Laar.* Analysis of thiodiglycol in urine of victims of an alleged attack with mustard gas. Part II // J. Anal. Toxicol. – 1988. – Vol. 12. – P. 15–19.

35. *Report of U.S.* Army Center for Health Promotion and Preventive Medicine. Candidate Biomarkers, http://chppm-www.apgea.army.mil/doem/EMP- files/bmark.doc.

36. *Boyer A.E., Ash D., Barr D.B., et al*., Quantitation of the sulfur mustard metabolites 1,1`-sulfonyl[2-(methylthio) ethane] and thiodiglycol in urine using isotope-dilution gas chromatography-tandem mass spectrometry // J. Anal. Toxicol. – 2004. – Vol. 28. – P. 327–332.

N. L. Koryagina, E. I. Savelieva, E. S. Ukolova, A. I. Ukolov, N.S. Khlebnikova, N. G. Voitenko, A.S. Radilov

Gas Chromatography–Mass Spectrometry Study of Toxicological Profiles of Blister Agents

Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology, Federal Unitary Enterprise, Federal Medical Biological Agency, g/p Kuzmolovsky, Vsevolozhsk District, Leningrad Region

The excretion profiles of biomarkers of blister agents after intoxication of rats by lewisite and piryte- lewisite mixture at a dose of 1.6 mg/kg were studied. The possibility of determination of lewisite markers in the organism after antidotal therapy with unithiol was assessed. It was found out that the excretion of 2-chlorovinylarsonous acid (CVAA) the first two days after unithiol treatment develops more actively as compared with that in the absence of antidotal therapy. It was shown that the most reliable biomarker to establish a retrospective exposure of an organism to sulfur mustard-lewisite mixtures is CVAA which was detected with confidence in urine 77 days after exposure, while sulfur mustard metabolites such as thiodiglycol, thiodiglycol sulfoxide, and β-lyase metabolites, could not be detected by existing procedures even 7 days after exposure.

Переработанный материал поступил в редакцию 11.04.2013 г.

УДК 54.06 : 615.21

Мониторинг новых производных фенилэтиламина, потребляемых населением Ханты-Мансийского автономного округа – Югры в немедицинских целях

С.В. Нехорошев[1],
С.П. Шарко[1],
В.А. Шевырин[2]
[1] Управление Федеральной службы РФ по контролю за оборотом наркотиков по Ханты-Мансийскому автономному округу – Югры (г. Ханты-Мансийск)
[2]Управление Федеральной службы РФ по контролю за оборотом наркотиков по Свердловской области (г. Екатеринбург)

В результате мониторингового исследования ассортимента психоактивных веществ, потребляемых в немедицинских целях населением Ханты-Мансийского автономного округа – Югры, обнаружено 18 новых производных фенилэтиламина: Метилон, Мефедрон, MDPV, 3-FMC, Бутилон, 2C-C, 4-MEC, PVP, MPPP, Пентилон, Пентедрон, Метедрон, 2C-E, 2C-I, 2C-B, PMMA, MDPBP и pFA. Для идентифицированных веществ получены масс-спектры и определены линейные индексы хроматографического удерживания.

Ключевые слова: *химический анализ, психоактивные вещества, производные фенилэтиламина, масс-спектры, индексы удерживания.*

Введение. На протяжении последних десятилетий проблема потребления населением психоактивных веществ в немедицинских целях не теряет своей актуальности. В течение довольно продолжительного периода времени на территории Ханты-Мансийского автономного округа – Югры (ХМАО) основными видами психоактивных веществ, являвшихся объектами злоупотреблений, оставались наркотики, получаемые из конопли (марихуана и гашиш) и мака (опий, героин, кодеин, маковая солома), а также наркотические производные фенилэтиламина (амфетамин, метамфетамин, эфедрон, катинон, МДА и др.). Однако начиная с 2008 года в регионе стали получать распространение новые виды психоактивных веществ, действенный государственный контроль за оборотом которых начал постепенно проявляться только в 2010 году. Одновременно с этим встал вопрос о химической идентификации этих веществ как в нативном виде, так и в биологических объектах.

Материалы и методы исследования. Исследование веществ проводили методом хроматомасс-спектрометрии при следующих условиях: хроматограф «Agilent Technologies 6850» с масс-селективным детектором «Agilent Technologies 5975C»; хроматографическая колонка капиллярная «HP-5MS» длиной 30 м, диаметром 0,25 мм, толщина неподвижной фазы 0,25 мкм; температура инжектора 250°С; температура интерфейса детектора 290°С; температурная программа хроматографической колонки – выдержка 3 мин. при 50°С, подъем температуры со скоростью 10°С/мин. до 280°С и выдержка при этой температуре 14 мин; газ-носитель гелий; скорость газа-носителя 1,0 мл/мин; ионизация электронным ударом (энергия 70 эВ); регистрацию ионов проводили в диапазоне от 40 до 500 m/z по полному ионному току; объем пробы 1 мкл в виде метанольного экстракта; ввод пробы с делением потока 1:40. Кроме исследуемых веществ, хроматографированию подвергали хлороформный раствор смеси алканов нормального строения с числом атомов углерода от 9 до 35. Регистрацию данных и их обработку проводили при помощи программного обеспечения «Enhanced Productivity MSD ChemStation». Результаты хроматомасс-спектрометрического исследования представлены в таблице. Линейные индексы удерживания (J) производных фенилэтиламина рассчитывали по формуле:

$$J = \frac{t - t_z}{t_{z+1} - t_z} + z,$$

где t – время удержания анализируемого вещества; t_z – время удержания нормального алкана с числом атомов углерода в молекуле, равном z; t_{z+1} – время удерживания нормального алкана с числом атомов углерода в молекуле, равном z+1, при условии элюирования хроматографического пика анализируемого вещества между пиками двух указанных выше нормальных алканов.

Результаты и обсуждение. Результаты исследований показали, что в период с 2008 по 2011 год из всего разнообразия психоактивных веществ, имеющих хождение на территории региона, значительную долю составляют новые производные фенилэтиламина, которые представляют собой порошки различной консистенции. Из хроматографических и спектральных методов анализа наиболее эффективным для идентификации производных фенилэтиламина оказался метод газо-жидкостной хроматографии с масс-селективным детектированием. Указанный комбинированный метод, при условии наличия информации о масс-спектре и параметрах хроматографического удерживания, позволяет надежно идентифицировать психоактивные вещества без использования их стандартных образцов. Так, в начале 2010 года в веществах, изымаемых из оборота на территории региона, с применением ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии были идентифицированы ранее неизвестные производные фенилэтиламина – Метилон и Мефедрон [1] (рис. 1). После появления во второй половине 2010 года в научно-методической литературе масс-спектров некоторых производных фенилэтиламина среди веществ, изымаемых из оборота у населения ХМАО, было обнаружено и идентифицировано три новых соединения: MDPV, 3-FMC и Бутилон [2] (рис. 1, 2). По мере накопления в контролирующих, медицинских и прочих государственных органах информации о распространении среди населения России новых психоактивных веществ на их оборот накладывались законодательные ограничения и запреты. В результате запрещенные вещества из оборота исчезали, а их место занимали ранее не известные вещества, оборот которых еще не ограничен на законодательном уровне, а также отсутствуют методики их идентификации и лабораторного контроля. Кроме этого стали проявляться тенденции к активному расширению ассортимента производных фенилэтиламина. В начале 2011 года впервые в обороте у населения региона появилось вещество 2C-C (рис. 2), которое было идентифицировано с использованием информации из электронной библиотеки масс-спектров «NIST 2.0» 2008 г/в. В этот же период среди веществ, изымаемых у населения, было идентифицировано новое производное фенилэтиламина – 4-MEC (рис. 2). Первоначально для идентификации 4-MEC были применены методы ЯМР-спектроскопии и хроматомасс-спектрометрии [3]. В дальнейшем, используя данные отечественной и зарубежной научно-методической литературы [4, 5], к середине 2011 года на территории региона среди веществ, потребляемых населением в немедицинских целях, было дополнительно идентифицировано 11 производных фенилэтиламина (рис. 2–5): PVP, MPPP, Пентилон, Пентедрон, Метедрон, 2C-E, 2C-I, 2C-B, PMMA, MDPBP и pFA.

Заключение. Таким образом, в ходе проведенных мониторинговых исследований были получены масс-спектры и определены параметры хроматографического удерживания 18 производных фенилэтиламина, 12 из которых входят в более узкую группу кетопроизводных фенилэтиламина с короткоцепочечными алифатическими заместителями в α-положении.

Динамика распространения среди населения новых производных фенилэтиламина, как одной из распространенных групп психоактивных веществ, потребляемых в немедицинских целях, показывает необходимость принятия активных мер государственного контроля в области противодействия незаконному распространению наркотиков и прочих психоактивных веществ, а также формированию научно-методической базы (системы) по их мониторингу.

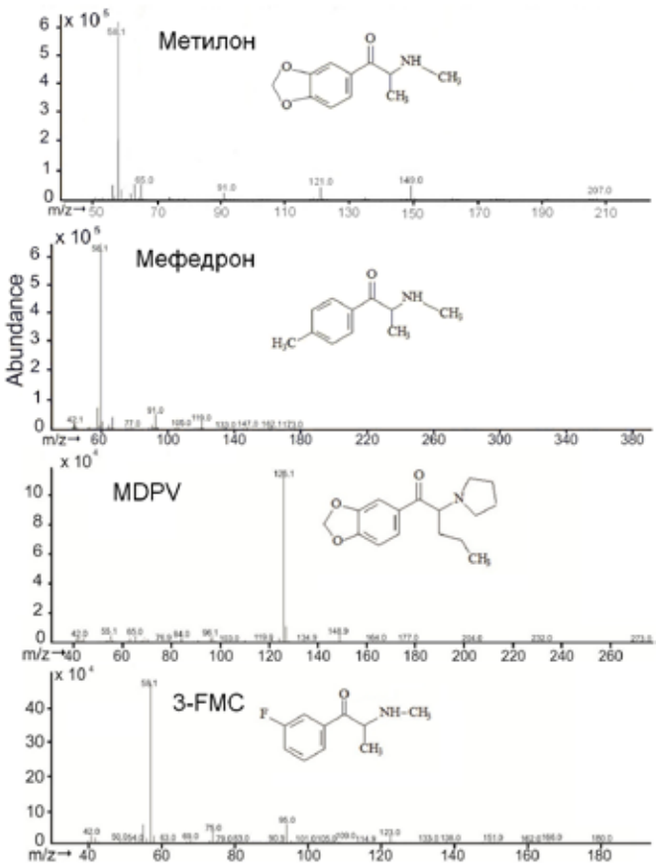


Рис. 1. Масс-спектры производных фенилэтиламина.

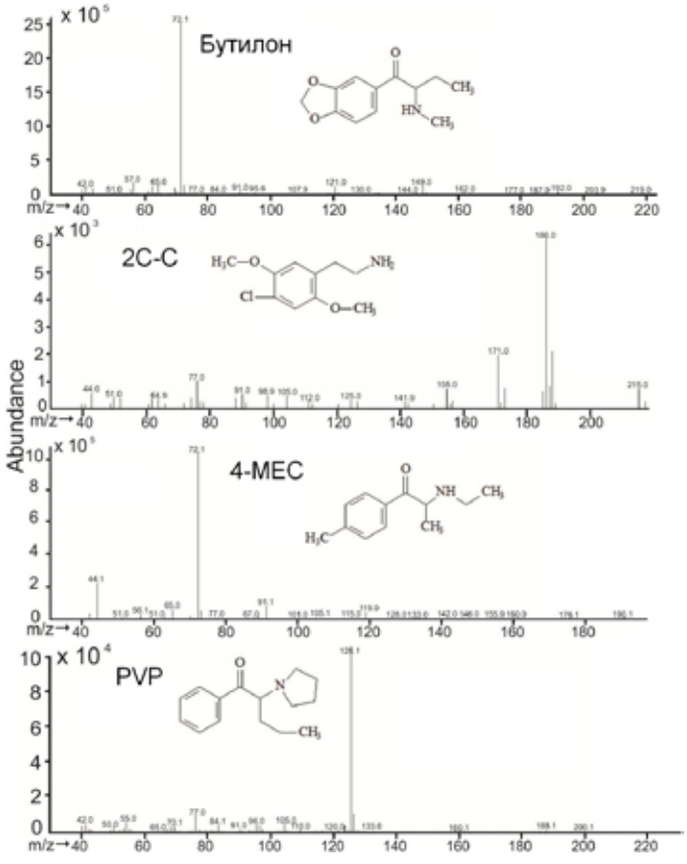


Рис. 2. Масс-спектры производных фенилэтиламина.

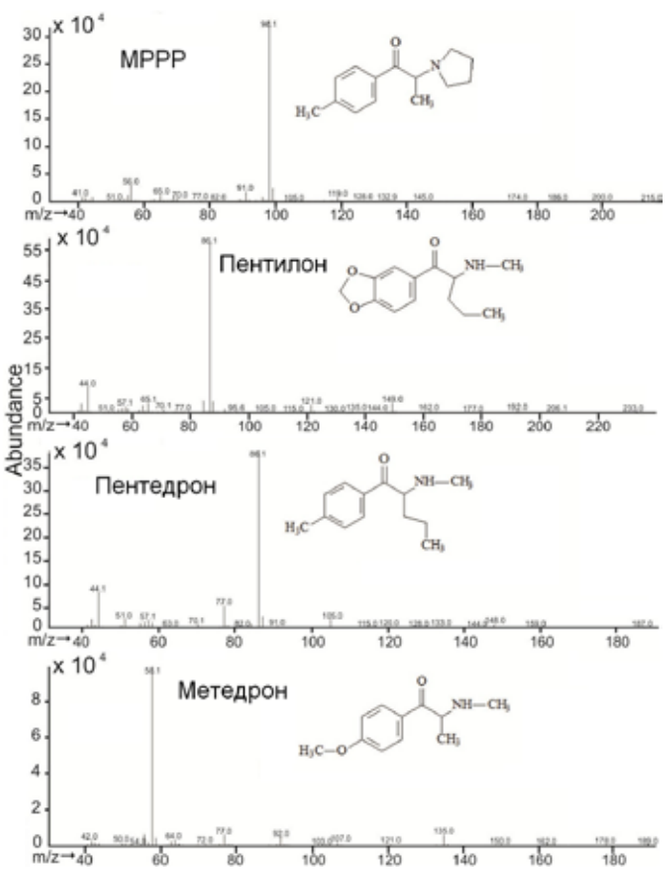


Рис. 3. Масс-спектры производных фенилэтиламина.

Таблица

Брутто-формулы, молекулярный вес (М, а.е.м.) и индексы хроматографического удерживания (I) производных фенилэтиламина

№	Сокращение	Название	Формула	M	I
1	Метилон, bk-MDMA	2-Метиламино-1-(3,4-метилендиоксифенил)пропан-1-он	$C_{11}H_{13}NO_3$	207	1721
2	Мефедрон, 4-MMC	2-Метиламино-1-(4-Метилфенил)пропан-1-он	$C_{11}H_{15}NO$	177	1462
3	MDPV	3,4-Метилендиоксипировалерон	$C_{16}H_{21}NO_3$	275	2177
4	3–FMC	2-Метиламино-1-(3-фторфенил)пропан-1-он	$C_{10}H_{12}FNO$	181	1327
5	Бутилон, bk-MBDB	2-Метиламино-1-(3,4-метилендиоксифенил)бутан-1-он	$C_{12}H_{15}NO_3$	221	1801
6	2C-C	4-Хлоро-2,5-диметоксифенэтиламин	$C_{10}H_{14}ClNO_2$	215	1760
7	4-MEC	1-(4-Метилфенил)-2-этиламинопропан-1-он	$C_{12}H_{17}NO$	191	1528
8	PVP	1-Фенил-2-пирролидин-1-илпентан-1-он	$C_{15}H_{21}NO$	231	1790
9	MPPP	4’-Метил-α-пирролидинопропиофенон	$C_{14}H_{19}NO$	217	1772
10	Пентилон, bk-MBDP	1-(1,3-Бензодиоксол-5-ил)-2-метиламинопентан-1-он	$C_{13}H_{17}NO_3$	235	1883
11	Пентедрон	2-(Метиламино)-1-фенилпентан-1-он	$C_{12}H_{17}NO$	191	1502
12	Метедрон, bk-PMMA	1-(4-Метоксифенил)- 2-(метиламино) пропан-1-он	$C_{11}H_{15}NO_2$	193	1653
13	2C-E	4-Этил-2,5-диметоксифенэтиламин	$C_{12}H_{19}NO_2$	209	1686
14	2C-I	4-Йодо-2,5-диметоксифенэтиламин	$C_{10}H_{14}INO_2$	307	1945
15	2C-B	4-Бромо-2,5-диметоксифенэтиламин	$C_{10}H_{14}BrNO_2$	259	1841
16	PMMA	Пара-метоксиметамфетамин	$C_{11}H_{17}NO$	179	1448
17	MDPBP	3’,4’-Метилендиокси-α-пирролидинобутирофенон	$C_{15}H_{19}NO_3$	261	2108
18	pFA	Пара-фторамфетамин	$C_9H_{12}FN$	153	1145

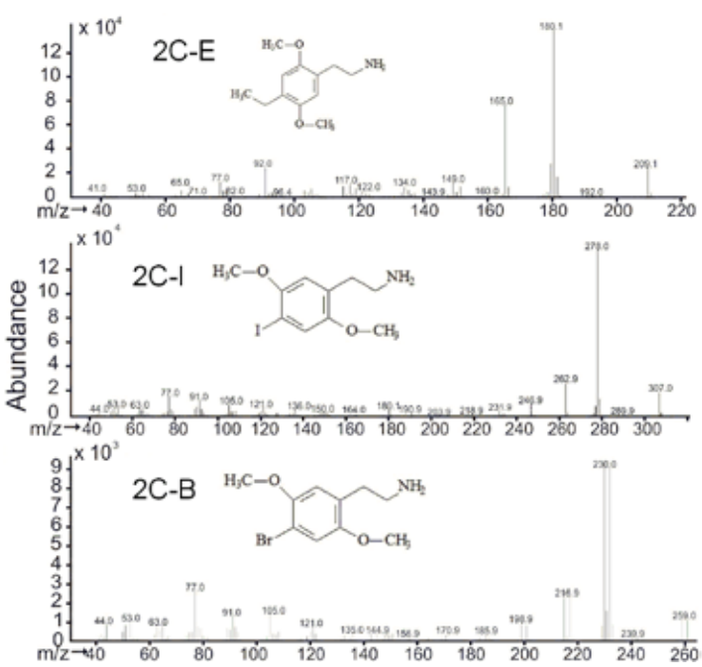


Рис. 4. Масс-спектры производных фенилэтиламина.

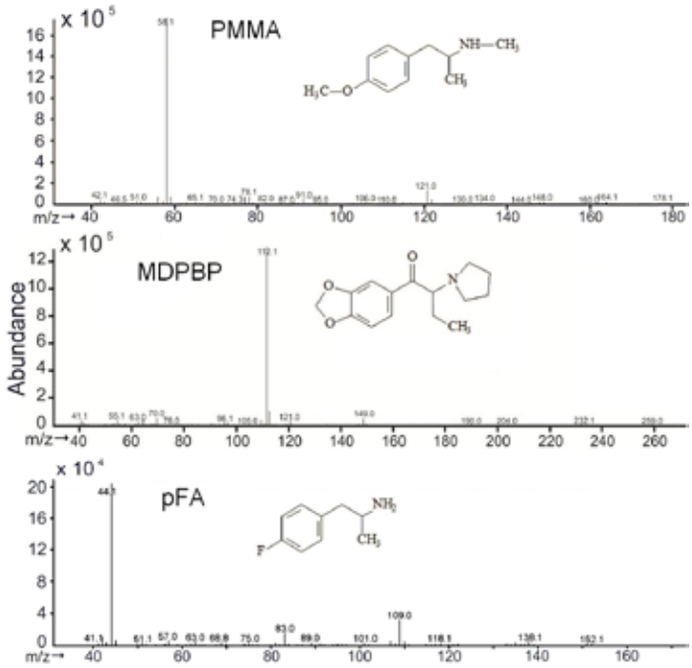


Рис. 5. Масс-спектры производных фенилэтиламина.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Нехорошев С.В.* Экспертное исследование новых производных амфетамина // Судебная экспертиза, 2010. – № 3. – С. 37–42.

2. Экспертное исследование некоторых наиболее распространенных «структурных аналогов» наркотических средств и психотропных веществ: Информационное письмо для экспертных подразделений / Шевырин В.А., Мелкозеров В.П. Екатеринбург: УФСКН РФ по Свердловской обл., ГУВД по Свердловской обл., 2010. – С. 34.

3. *Нехорошев С.В.* 4-Метилэткатинон (4-MEC) – новый представитель «легальных наркотиков» амфетаминовой группы // Судебная экспертиза, 2011. – № 1. – С. 19–23.

4. Дизайнерские наркотики. Криминалистическое исследование «структурных аналогов» пировалерона, производных наркотического средства N-метилэфедрона: Информационное письмо для экспертных подразделений / Шевырин В.А., Мелкозеров В.П. Екатеринбург: УФСКН РФ по Свердловской обл., ГУВД по Свердловской обл., 2011. – С. 22.

5. *Takahashi M., Nagashima M., Suzuki J., Seto T., Yasuda I., Yasuda T.* Creation and application of psychoactive designer drugs data library using liquid chromatography with photodiode array spectrophotometry detector and gas chromatography – vass spectrometry. Talanta, 2009. – № 77. – P. 1245–1272.

S.V.Nekhoroshev[1], S.P. Sharko[1], V.A. Shevyrin[2]

Monitoring of new phenyl ethylamine derivatives used by the Khanty-Mansiisk Autonomous Area – Yugra population for non-medical purposes

[1]Administration of the Federal Drug Control Service of the Russian Federation in the Khanty-Mansiisk Autonomous Area-Yugra
[2]Administration of the Federal Drug Control Service of the Russian Federation in the Sverdlovsk Region, Ekaterinburg

As a result of a monitoring study of a range of psychoactive substances used by the Khanty-Mansiisk Autonomous Area-Yugra population for non-medical purposes, 18 new phenyl ethylamine derivatives were revealed including Methylone Mephedrone, MDPV, 3-FMC, Butylone, 2C-C, 4-MEC, PVP, MPPP, Pentylone, Pentedrone, Methedrone, 2C-E, 2C-I 2C-B, PMMA, MDPBP and pFA. Mass-spectrums and chromatographic retention linear indices were obtained for the identified substances.

Материал поступил в редакцию 21.05.2012 г.

ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ ТОКСИКОЛОГИЯ

УДК 574.5:615.9 (262.5)

А.С. Федотов

Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства
и океанографии
(ФГУП «ВНИРО»), Москва

Оценка токсичности технологических добавок для интенсификации помола «Литопласт 1АИ» и «Литопласт 2АИ» для рыб

Проведена оценка токсичности технологических добавок для интенсификации помола «Литопласт 1АИ» и «Литопласт 2АИ» для стандартных тест-объектов: рыб – односуточных мальков гуппи (Poecillia reticulate Peters) и сеголетков карпа (Cyprinus carpio L). Для оценки токсического эффекта для рыб использовали показатели медианных летальных концентраций ($ЛК_{50}$), характеризующие изменение выживаемости (гибель) рыб на 50% за определенное время – 96 ч ($ЛК_{50}$/96 ч). По результатам оценки токсичности препаратов установлено: технологические добавки для интенсификации помола «Литопласт 1АИ» и «Литопласт 2АИ» относятся к очень слаботоксичным веществам.

Ключевые слова: *препараты, рыба, мальки, сеголетки, токсичность.*

Введение. В настоящее время при производстве цемента применяются различные смесевые химические препараты. Эффективность использования данных препаратов зависит от вещественного состава сырьевого шлама и минерального состава клинкера. Тип интенсификатора подбирается непосредственно под минералогический состав клинкера, минеральных добавок. С учетом зависимости эффективности от вещественного состава сырьевого шлама и минералогического состава клинкера «Литопласт АИ» подразделяют на типы: «Литопласт 1АИ» и «Литопласт 2АИ». По отпускной форме продукты в форме водных растворов.

Задачей данной работы служила оценка токсичности технологических добавок для интенсификации помола «Литопласт 1АИ» и «Литопласт 2АИ» для стандартных пресноводных тест-объектов: рыб – односуточных мальков (*Poecillia reticulate* Peters) и сеголетков карпа (*Cyprinus carpio* L.).

Материалы и методы исследования. Технологические добавки для интенсификации помола «Литопласт 1АИ» и «Литопласт 2АИ» представляют собой водные растворы с характерным запахом нафталинформальдегидного суперпластификатора. Внешний вид «Литопласт 1АИ» – жидкость светло-коричневого цвета; «Литопласт 2АИ» – жидкость темно-коричневого цвета. Массовая доля сухого вещества – не менее 40%. Плотность при 20°С – 1,0 г/см^3.

Предназначены для интенсификации помола клинкера при производстве цемента, интенсификации помола глин [4].

Для оценки токсичности представленных образцов препаратов «Литопласт 1АИ» и «Литопласт 2АИ» использовали стандартные пресноводные тест-объекты: мальки рыб – односуточные организмы гуппи *Poecillia reticulate* Peters и сеголетки карпа – *Cyprinus carpio* L.

Исследование токсичности препаратов проводили в соответствии с «Руководством по определению методом биотестирования токсичности вод, донных отложений, загрязняющих веществ и буровых растворов» (утверждено МПР России, 27 апреля 2001 г.) [3].

Определяли $ЛК_{50}$ препаратов «Литопласт 1АИ» и «Литопласт 2АИ» на рыбах за 4 суток (96 ч).

Мальки рыб – *Poecillia reticulate* Peters – гуппи, широко распространенная аквариумная живородящая рыбка. В природе встречается как в пресной, так и в соленой воде, используется в экспериментах по оценке токсичности различных пресноводных и морских образцов проб, а также при определении предельно-допустимых концентраций (ПДК) загрязняющих веществ для водных объектов рыбохозяйственного значения (пресноводных и морских). В опыте используют высокочувствительные односуточные мальки данных рыб.

Исследование технологических добавок для интенсификации помола «Литопласт 1АИ» и «Литопласт 2АИ» проводили в аквариальной, с использованием рассеянного света и естественного светового периода. Длительность биотестирования составляла 4 суток (96 ч). Во время биотестирования рыб не кормили. Температура анализируемой пробы 20–22°С, концентрация растворенного кислорода 8,6 мг/дм^3. Соотношение воды и ихтиомассы составляло менее 1,5 г/л, на каждую концентрацию приходилось по 10 экземпляров рыбок в опытах и контроле.

Физиологическую активность рыб проверяли по стандартному веществу – калию двухромовокислому. $ЛК_{50}$ $K_2Cr_2O_7$ за 24 ч составила 127,0 мг/дм^3 (что укладывается в диапазон требуемых концентраций – 106–175 мг/дм^3).

Сеголетки рыб: для исследований подбирали некрупных одноразмерных рыб в хорошем физиологическом состоянии из водного объекта, благополучного в отношении инфекционных и инвазионных, а также массовых незаразных заболеваний. *Cyprinus carpio* L. используются в экспериментах по оценке токсичности различных пресноводных образцов проб, а также при определении предельно-допустимых концентраций (ПДК) загрязняющих веществ для водных объектов рыбохозяйственного значения (пресноводных). В опыте используют сеголеток данных рыб.

Исследование технологических добавок для интенсификации помола «Литопласт 1АИ» и «Литопласт 2АИ» проводили в аквариальной, с использованием рассеянного света и естественного светового периода.

Длительность острых опытов составляла 4 суток (96 ч). Во время биотестирования рыб не кормили. Температура анализируемой пробы 18–20°С, концентрация растворенного кислорода 8,2–8,6 мг/дм^3. Соотношение воды и ихтиомассы составляло менее 3,0 г/л, на каждую концентрацию приходилось по 5 экземпляров рыб в опытах и контроле.

Опыты на молоди рыб и сеголетках карпа проведены в 3-кратной повторности. Каждому опыту соответствовал контроль. По окончании опытов методом пробит-анализа по В.Б. Прозоровскому [2] рассчитывали параметры токсичности: $ЛК_{50}$.

Все исследования проводили на фоне контроля (без внесения препаратов).

Степень острой токсичности технологических добавок для интенсификации помола «Литопласт 1АИ» и «Литопласт 2АИ» для рыб оценивали согласно классификации Лесникова Л.А. и Врочинского К.К. [1].

Результаты и обсуждение. Результаты исследования токсичности технологической добавки для интенсификации помола «Литопласт 1АИ» на односуточных гуппи в остром опыте длительностью 96 часов представлены в таблице 1.

Таблица 1

Динамика выживаемости односуточных гуппи в растворах с различными концентрациями препарата «Литопласт 1АИ» в остром опыте, 96 ч, n = 30

Концентрация, мг/л	Сутки опыта			
	1-е	2-е	3-и	4-е
	Выживаемость организмов, экз.			
Контроль	30	30	30	30
100,0	30	30	30	30
500,0	30	30	30	30
1000,0	30	30	30	30
2000,0	30	30	30	30
3000,0	30	30	30	30
4000,0	30	30	30	30
5000,0	30	30	30	30
% от контроля				
Контроль	100	100	100	100
100,0	100	100	100	100
500,0	100	100	100	100
1000,0	100	100	100	100
2000,0	100	100	100	100
3000,0	100	100	100	100
4000,0	100	100	100	100
5000,0	100	100	100	100

Данные таблицы 1 показывают, что в концентрациях 100,0–5000,0 мг/л гибели односуточных мальков не отмечено на протяжении всей экспозиции опыта. Расчетная полулетальная концентрация ($ЛК_{50}$ за 96 ч) технологической добавки для интенсификации помола «Литопласт 1АИ» для мальков рыб более 5000,0 мг/л.

Результаты исследований по изучению динамики выживаемости односуточных гуппи в растворах с различными концентрациями технологической добавки для интенсификации помола «Литопласт 2АИ» в остром опыте длительностью 96 ч представлены в таблице 2.

Таблица 2

Динамика выживаемости односуточных гуппи в растворах с различными концентрациями препарата «Литопласт 2АИ» в остром опыте, 96 ч, n = 30

Концентрация, мг/л	Сутки опыта			
	1-е	2-е	3-и	4-е
	Выживаемость организмов, экз.			
Контроль	30	30	30	30
100,0	30	30	30	30
500,0	30	30	30	30
1000,0	30	30	30	30
2000,0	30	30	28	24
3000,0	30	30	25	20
4000,0	30	27	23	13
5000,0	30	22	14	0
% от контроля				
Контроль	100	100	100	100
100,0	100	100	100	100
500,0	100	100	100	100
1000,0	100	100	100	100
2000,0	100	100	93,3	83,3
3000,0	100	100	86,7	66,7
4000,0	100	90,0	76,7	43,3
5000,0	100	73,3	46,7	0

Представленные в таблице 2 данные показывают, что в концентрациях 100,0–1000,0 мг/л гибели односуточных мальков гуппи не отмечено на протяжении всей экспозиции опыта.

В концентрации 2000,0; 3000,0; 4000,0 и 5000,0 мг/л на 3–4-е; 3–4-е; 2–4-е и 2–3-е сутки опыта отмечена гибель мальков: 6,7–16,7; 13,3–33,3; 10,0–56,7 и 26,7–53,3% соответственно по сравнению с контролем.

На 4-е сутки в концентрации препарата, равной 5000,0 мг/л, наблюдается 100%-ная гибель односуточных мальков гуппи.

Расчетная полулетальная концентрация ($ЛК_{50}$ за 96 ч) технологической добавки для интенсификации помола «Литопласт 2АИ» для односуточных мальков гуппи равна 3527,3 мг/л.

Результаты исследования токсичности технологической добавки для интенсификации помола «Литопласт 1АИ» на сеголетках карпа в остром опыте длительностью 96 ч представлены в таблице 3.

Данные таблицы 3 показывают, что в диапазоне исследованных концентраций от 100,0 до 5000,0 мг/л гибели сеголетков карпа не отмечено на протяжении всей экспозиции опыта.

Расчетная полулетальная концентрация ($ЛК_{50}$ за 96 ч) технологической добавки для интенсификации помола «Литопласт 1АИ» для сеголетков карпа более 5000,0 мг/л.

Результаты исследования токсичности технологической добавки для интенсификации помола «Литопласт 2АИ» на сеголетках карпа в остром опыте длительностью 96 ч представлены в таблице 4.

Данные таблицы 4 показывают, что в концентрациях препарата 100,0–3000,0 мг/л гибели сеголетков карпа не отмечено на протяжении всей экспозиции опыта.

В концентрациях 4000,0 и 5000,0 мг/л на 4-е и 3–4-е сутки опыта отмечена гибель рыб, составляющая 13,3; 13,3–33,3% соответственно по сравнению с контролем.

Расчетная полулетальная концентрация ($ЛК_{50}$ за 96 ч) технологической добавки для интенсификации помола «Литопласт 2АИ» для сеголетков карпа более 5000,0 мг/л.

При исследовании токсичности технологических добавок для интенсификации помола «Литопласт 1АИ» и «Литопласт 2АИ» результат оценивается по наиболее чувствительному тест-объекту, который характеризуется наименьшей токсичной концентрацией из всех полученных для различных тест-организмов (в данном случае – на разные стадии развития рыб: мальки и сеголетки).

Обобщение полученных результатов исследования технологических добавок для интенсификации помола «Литопласт 1АИ» и «Литопласт 2АИ» по оценке их полулетальных концентраций ($ЛК_{50}$) для рыб – односуточных мальков гуппи и сеголетков карпа – представлены в таблице 5.

Как видно из таблицы 5, для препаратов «Литопласт 1АИ» и «Литопласт 2АИ» такими концентрациями являются соответственно >5000,0 для мальков гуппи и сеголеток карпа и 3527,3 мг/л для мальков рыб, то есть препараты оказали слабое токсичное действие на ранние стадии развития рыб.

Выводы. По классификации Л.А. Лесникова и К.К. Врочинского [3] по степени острой токсичности технологических добавок для интенсификации помола «Литопласт 1АИ» и «Литопласт 2АИ» оцениваются как:

– «Литопласт 1АИ» **очень слаботоксичная** ($ЛК_{50}$ более 500,0 мг/л) для водных организмов ($ЛК_{50}$ для мальков гуппи и сеголетков карпа более 5000,0 мг/л);

– «Литопласт 2АИ» **очень слаботоксичная** ($ЛК_{50}$ более 500,0 мг/л) для водных организмов ($ЛК_{50}$ для мальков рыб 3527,3 мг/л).

Таблица 3

Динамика выживаемости сеголетков карпа в растворах с различными концентрациями препарата «Литопласт 1АИ» в остром опыте, 96 ч, n = 15

Концентрация, мг/л	Сутки опыта			
	1-е	2-е	3-и	4-е
	Выживаемость организмов, экз.			
Контроль	15	15	15	15
100,0	15	15	15	15
500,0	15	15	15	15
1000,0	15	15	15	15
2000,0	15	15	15	15
3000,0	15	15	15	15
4000,0	15	15	15	15
5000,0	15	15	15	15
% от контроля				
Контроль	100	100	100	100
100,0	100	100	100	100
500,0	100	100	100	100
1000,0	100	100	100	100
2000,0	100	100	100	100
3000,0	100	100	100	100
4000,0	100	100	100	100
5000,0	100	100	100	100

Таблица 4

Динамика выживаемости сеголетков карпа в растворах с различными концентрациями препарата «Литопласт 2АИ» в остром опыте, 96 ч, n = 15

Концентрация, мг/л	Сутки опыта			
	1-е	2-е	3-и	4-е
	Выживаемость организмов, экз.			
Контроль	15	15	15	15
100,0	15	15	15	15
500,0	15	15	15	15
1000,0	15	15	15	15
2000,0	15	15	15	15
3000,0	15	15	15	15
4000,0	15	15	15	13
5000,0	15	15	13	10
% от контроля				
Контроль	100	100	100	100
100,0	100	100	100	100
500,0	100	100	100	100
1000,0	100	100	100	100
2000,0	100	100	100	100
3000,0	100	100	100	100
4000,0	100	100	100	86,7
5000,0	100	100	86,7	66,7

Таблица 5

Сводная таблица результатов исследования токсичности препаратов для рыб

Технологическая добавка для интенсификации помола «Литопласт 1АИ»	Рыба		Слабое звено
	Односуточные мальки гуппи $ЛК_{50}$/96 ч, мг/л	Сеголетки карпа $ЛК_{50}$/96 ч, мг/л	
	>5000,0	>5000,0	$ЛК_{50}$/96 ч для односуточных мальков гуппи и сеголетков карпа >5000,0 мг/л
Технологическая добавка для интенсификации помола «Литопласт 2АИ»	**Рыба**		**Слабое звено**
	Односуточные мальки гуппи $ЛК_{50}$ (96 ч), мг/л	Сеголетки карпа $ЛК_{50}$ (96 ч), мг/л	
	3527,3	>5000,0	Односуточные мальки гуппи (3527,3 мг/л)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Методические указания по рыбохозяйственной оценке пестицидов. ГосНИОРХ. Л., 1973.
2. *Прозоровский В.Б.* Использование метода наименьших квадратов для пробит-анализа кривых летальности // Фармакология и токсикология. М., 1962. – С. 68–79.
3. Руководство по определению методом биотестирования токсичности вод, донных отложений, загрязняющих веществ и буровых растворов. Утв. МПР России 27 апреля 2001 г. ,М.: Изд. РЭФИ, НИА-Природа, 2002.
4. Технологические добавки для интенсификации помола: «Литопласт 1АИ» / «Литопласт 2АИ». М.: ООО «ПОЛИПЛАСТ НОВОМОСКОВСК», 2011. – 2 с.

A.S. Fedotov

Evaluation of toxicity of technological additives «Litoplast 1AI» and «Litoplast 2AI» designed to intensify grinding for fish

Russian Research Institute of Fisheries and Oceanography, Moscow

Toxicity of technological additives «Litoplast 1AI» and «Litoplast 2AI» for grinding intensification was evaluated on fish standard test-objects: one-day guppy baby-fish *(Poecillia reticulate Peters)* and one of the year carp (Cyprinus carpio L.). To assess toxic effect on fish, indicators of median lethal concentrations (LC_{50}) characterizing survival changes (death) by 50% for a determined time period-96 h (LC_{50}/96h) were applied. Based on evaluation results of the preparations toxicity, it was established that grinding intensifications technological additives «Litoplast 1AI» and «Litoplast 2AI» refer to very slight toxic substances.

Материал поступил в редакцию 21.05.2012

УДК 597.554.3.612.017+574.47

Некоторые показатели иммуно-физиологического статуса голавля Leuciscus cephalus, обитающего в реках Кавказа

Н.И. Силкина,
В.Р. Микряков,
Д.В. Микряков

Институт биологии внутренних вод
им. И.Д. Папанина РАН, Борок, Ярославская обл.

Приведены результаты сравнительного исследования иммуно-физиологических показателей кавказского голавля Leuciscus cephalus, обитающего в реках Кавказа по данным анализа антимикробных свойств сыворотки крови, содержания неспецифических иммунных комплексов и соматических индексов иммунокомпетентных органов. Рыбы из реки Мзымты отличались от таковых из рек Абхазии повышенными соматическими индексами иммунокомпетентных органов, функциональным состоянием гуморальных факторов иммунитета, высокой долей ИМД особей.

Ключевые слова: *голавль, реки, иммуно-физиологические показатели*

Введение. Кавказский голавль *Leuciscus cephalus* – типичный представитель ихтиофауны речных экосистем Кавказа, служит традиционным объектом спортивного и любительского рыболовства, обитает на участках рек с быстрым и умеренным течением, по типу питания относится к эврифагам [1, 13, 16]. В настоящее время численность данного вида рыб снижается, что, вероятно, связано с интенсификацией антропогенной нагрузки и зарегулированием стока рек [11, 13]. Известно, что физиологическое и иммуно-биохимическое состояние организма рыб зависит от места обитания, гидрологического и гидрохимического режима водоема (водность, протяженность, скорость течения, минеральный состав воды и др.), особенностей кормовой базы, загрязнения вод различными по природе и происхождению поллютантами и др. Под воздействием стресс-факторов биотической и абиотической природы нарушается функционирование иммунологических и биохимических механизмов гомеостаза, обеспечивающих оптимальный рост, развитие и индивидуальную целостность организма рыб [2, 6, 7, 17].

Исходя из вышеизложенного, нами проведено изучение иммуно-физиологического статуса голавля, обитающего в реках Кавказского побережья Черного моря.

Материал и методы исследования. Материалом для анализа послужили 52 половозрелые особи кавказского голавля *Leuciscus cephalus* средней массой 340–370 г и длиной 26–31 см, отловленные в конце сентября – первой декаде октября 2011 г. выше (1,5–2 км) устья рек Мзымта (Краснодарский край), Бзыбь и Гагрипш (Абхазия).

Река Мзымта, самая крупная из рек Главного Кавказского хребта, берет свое начало из небольшого озера на южном склоне Главного Кавказского хребта на высоте 2440 м и впадает в Черное море в Адлерском районе Сочи. Длина реки 89,7 км, площадь водосбора 885 кв. км, густота речной сети 1,48 км/кв. км. Скорость течения реки колеблется от 0,4–1,2 м/с (на плесах) до 2–3 м/с, преобладающая – 1,8 м/с. Русло реки извилистое, слаборазветвленное, берегами служат уступы террас глубиной до 10 м. Дно русла скалистое с валунами, в среднем и нижнем течении галечниковое или галечно-валунное. Река Мзымта, по данным Росгидромета (www.ewnc.org), отличается от рек Бзыби и Гагрипш высоким содержанием нитритного азота, нефтепродуктов, фосфатов, СПАВ, кроме того, в бассейн реки попадают мышьяк, фенол, радиоактивные отходы с объектов олимпийской стройки и отвалов свалки РЖД. Реки Абхазии можно считать условно чистыми, поскольку здесь полностью отсутствуют промышленные предприятия. Крупная река Бзыбь протяженностью 112 км и площадью бассейна 1510 кв. км берет начало на главном Кавказском хребте, питается за счет ледников, течёт в узком ущелье, в связи с чем происходят значительные сезонные колебания уровня воды (до 10–15 м). Небольшая река Гагрипш (длиной 15 км) берет своё начало с передовых хребтов, протекает по низменности, приобретая характер родниковых рек. Режим обеих рек Абхазии характеризуется сезонными колебаниями. Они не замерзают зимой из-за теплого климата, а в связи с горным характером истока во время таяния ледников полноводны.

Соматические индексы (печени, почки, селезенки) рассчитывали согласно общепринятой методике [10]. Функциональное состояние гуморального звена неспецифического иммунитета оценивали по бактериостатическим свойствам сыворотки крови (БАСК) и содержанию неспецифических иммунных комплексов (НИК). БАСК рыб определяли нефелометрическим методом, адаптированным нами для рыб [5]. В качестве тест-бактерий использовали суточную бактериальную культуру *Aeromonas hydrophila*. Учитывали долю иммунодефицитных по БАСК особей (ИМД), сыворотка крови которых не угнетала развития тест-микробов. Содержание НИК в сыворотке крови устанавливали методом Гриневич и Алферова [3], адаптированным для водных гидробионтов, используя метод преципитации с 7%-ным полиэтиленгликолем. Результаты исследований подвергали статистической обработке при помощи стандартного пакета программ (приложение Statistica 6.0) с использованием t-теста, $p<0.05$.

Результаты и обсуждение. Сравнительный анализ полученных результатов показал, что голавли, отловленные в реке Мзымта, достоверно отличались по величине исследуемых иммуно-физиологических показателей от особей из рек Бзыбь и Гагрипш, тогда как таковые между рыбами из абхазских рек отсутствовали (табл.).

Повышенные соматические индексы иммунокомпетентных органов (табл.), установленные у рыб из реки Мзымта (печени, туловищной почки, селезенки), выполняющих функции синтеза специфических антител, иммунокомпетентных клеток, белков плазмы крови, нейтрализации и разрушения чужеродных тел, разрушения и элиминации их из организма, по-видимому, обусловлены токсикантиндуцированной активизацией пролиферативных и дегенеративных процессов. Ранее авторами показаны [5, 6, 14, 15] сходные результаты, полученные на рыбах, обитающих в техногенно-загрязненных водоемах. Аналогичные патологические реакции в иммунокомпетентных тканях рыб отмечаются на ранних стадиях инфекционных болезней [5, 6].

Низкий уровень БАСК, отражающий функциональное состояние гуморальных факторов естественного иммунитета (системы комплемента, лизоцима, b-лизина, пропердина и др.) [5], и высокая доля ИМД особей, выявленных в выборке рыб из реки Мзымта по сравнению с таковыми из абхазских рек, свидетельствуют об иммуносупрессивном действии загрязнений на механизмы врожденного гуморального иммунитета и активации образования НИК под влиянием токсикантов (табл.). Известно, что НИК-комплексы, состоящие из антиген-антител и связанных с ними компонентов системы комплемента, играют важную роль в процессах регуляции иммунных реакций, элиминации ксенобиотиков из организма и поддержании иммуно-физиологического гомеостаза. Избыточное образование НИК, как правило, происходит при насыщении организма чужеродными телами, в том числе аутоантигенами, инфекционными и токсическими агентами вследствие снижения клиринговой функции клеток фагоцитарной системы [4, 12]. Повышенный уровень НИК наблюдается при инфекционных, токсических и аутоиммунных болезнях, вызывающих супрессию механизмов иммунного гомеостаза и неконтролируемые патологические процессы [12]. По-видимому, повышенные показатели НИК у голавля из реки Мзымта – одна из причин снижения БАСК.

Заключение. Таким образом, проведенные исследования показали существенные различия в функционировании иммуно-физиологических механизмов гомеостаза у голавля, обитающего в реках Кавказа. Рыбы из реки Мзымта отличались от таковых из рек Абхазии повышенными соматическими индексами иммунокомпетентных органов, функциональным состоянием гуморальных факторов иммунитета, высокой долей ИМД особей. Аналогичные нарушения темпов и направления иммуно-физиологических процессов отмечены у рыб, обитающих в антропогенно трансформированных пресноводных экосистемах, загрязненных сточными водами крупных населенных пунктов, промышленных и горно-обогатительных предприятий и т.д. [5–9, 11, 14, 15].

Установленные модификации в функционировании иммуно-физиологических механизмов гомеостаза рыб из реки Мзымта следует рассматривать как типичную адаптивную реакцию рыб на загрязняющие вещества. Поступающие в Мзымту поллютанты – причина нарушения иммунофизиологического статуса голавля, проявляющегося супрессией функций иммунной системы и снижением адаптационного потенциала рыб. Выявленные отличия иммуно-физиологических показателей отражают характер влияния поллютантов на рыбное население и условия среды обитания.

Таблица

Показатели иммуно-физиологического статуса голавля Leuciscus cephalus из рек Кавказа

Реки	Индексы иммуннокомпетентных органов, %			БАСК, %	ИМД, %	Концентрация ЦИК в сыворотке крови, усл. ед.
	печень	почка	селезенка			
Мзымта	1,88±0.03	0,39±0.02	0,35±0.07	18,7±2.9	40	2.30±0.03
Бзып	1,75±0.05*	0,36±0.02*	0,26±0.04*	28,9±3.5*	5*	2.17±0.03*
Гагрипш	1,63±0.01*	0,33±0.01*	0,24±0.05*	30,1±3.7*	7*	2.05±0.04*

Примечание. * – достоверно для значений относительно р. Мзымта при $P \leq 0.05$.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Атлас пресноводных рыб России. Под редакцией Ю.С. Решетникова. М.: Наука, 2002. – Т. 1. – С. 379.

2. *Володин В.М.* Состояние воспроизводительной системы и плодовитость рыб в Северо-Шекснинском плесе Рыбинского водохранилища // Влияние стоков Череповецкого промышленного узла на экологическое состояние Рыбинского водохранилища. Рыбинск, 1990. – С. 101–122.

3. *Гриневич Ю.А., Алферов А.Н.* Определение иммунных комплексов в крови онкологических больных // Лабораторное дело, 1981. – № 8. – С.493–496.

4. *Логинов С.И., Смирнов П.Н., Трунов А.Н.* Иммунные комплексы у животных и человека: норма и патология. РАСХН. Сиб. отделение. ИЭВС и ДВ. Новосибирск, 1999. – 144 с.

5. *Микряков В.Р.* Закономерности формирования приобретенного иммунитета у рыб. Рыбинск: ИБВВ РАН, 1991. – 154 с.

6. *Микряков В.Р., Андреева А.М., Лапирова Т.Б, Силкина Н.И.* Реакция иммунной системы рыб Шекснинского плеса после аварии на промышленных предприятиях г. Череповца // Сб. «Влияние стоков промышленного узла на экологическое состояние Рыбинского водохранилища». Рыбинск, 1990. – С.144–155.

7. *Микряков В.Р, Балабанова Л.В., Заботкина Е.А. и др.* Реакция иммунной системы рыб на загрязнение воды токсикантами и закисление среды. М.: Наука, 2001. – 126 с.

8. *Моисеенко Т.И.* Водная экотоксикология: Теоретические и прикладные аспекты. М.: Наука, 2009. – 400 с.

9. *Немова Н.Н., Высоцкая Р.У.* Биохимическая индикация состояния рыб. М.: Наука, 2004. – 215 с.

10. *Правдин И.Ф.* Руководство по изучению рыб (преимущественно пресноводных). М.: Пищевая промышленность, 1966. – 376 с.

11. *Решетников Ю.С., Попова О.А., Кашулин Н.А. и др.* Оценка благополучия рыбной части водного сообщества по результатам морфопатологического анализа рыб // Успехи современной биологии, 1999. – Т. 119. – № 2. – С. 165–177.

12. 12. *Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д.* Иммунология, 2000. М.: Мир. – 592 с.

13. Рыбы в заповедниках России: «Пресноводные рыбы». Том 1. Под ред. Ю.С. Решетникова, М. 2010.

14. *Силкина Н.И., Микряков В.Р., Микряков Д.В.* Особенности липидного обмена леща *Abramis brama*, обитающего в реках Южного Урала // Экология, 2010. – № 6. – С. 403–408.

15. *Силкина Н.И., Микряков Д.В., Микряков В.Р.* Влияние антропогенного загрязнения на окислительные процессы в печени рыб Рыбинского водохранилища // Экология, 2012. – № 5. – С. 361–365.

16. *Троицкий С.К., Цуникова Е.П.* Рыбы бассейнов нижнего Дона и Кубани. Ростов-на-Дону: Кн. Изд-во, 1988. – 112 с.

17. Экологические проблемы Верхней Волги: Коллективная монография. Ярославль: Изд-во ЯГТУ, 2001. – 427 с.

N.I. Silkina, V.R. Mikryakov, D.V.Mikryakov

Some indicators of the immune and physiological status of roach back (Leuciscus cephalus) inhabiting Caucasus rivers

I.D. Papanin Institute for Biology of Inland Waters, Russian Academy of Sciences, Settlement Borok, Yaroslavl Region

Results of a comparative study on immune and physiological indicators in Caucasus roach back Leuciscus cephalus inhabiting Caucasus rivers are presented. The study is based on the analysis of antimicrobial properties of blood serum, content of non-specific immune complexes and somatic indices of immunocompetent organs. Fishes in the river Mzymty differed from those in Abkhazia rivers in increased somatic indicators of immunocompetent organs, functional state of humoral immune factors, high share of immunodeficiency in individual fishes.

Переработанный материал поступил в редакцию 25.03.2013 г.

СЪЕЗДЫ, КОНФЕРЕНЦИИ, СОВЕЩАНИЯ

Информация о проведении научно-практической конференции «Актуальные проблемы оценки безопасности лекарственных средств»

28 марта 2013 года была проведена 4-я ежегодная конференция, организованная секцией лекарственной токсикологии Российского общества токсикологов совместно с Научно-исследовательским институтом фармации Первого московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова. Как и 3 предыдущие конференции, она была посвящена актуальным вопросам доклинической оценки безопасности лекарственных средств.

В работе конференции приняли участие сотрудники научно-исследовательских институтов и других научных учреждений (НИИ фармации ГБОУ ВПО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова», ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России, ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России, ФГБУ «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства», Всероссийский научный центр по безопасности биологически активных веществ, ГНУ ВИЛАР РАСХН, Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, МГУ им. М.В. Ломоносова, ФГУП «ГНЦ Ниопик», МФТИ, НИИ Митоинженерии, ФГБУ «Научный центр клинической и экспериментальной медицины» СО РАМН, ФГБУН «Институт физиологически активных веществ РАН», ФГБУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи», ФГУП «ГосНИИОХТ», ФГБУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова» РАМН, а также представители ведущих отечественных и зарубежных фармацевтических компаний и фармацевтических заводов из Москвы, Московской области, Санкт-Петербурга, Новосибирска.

С приветственным словом к участникам конференции обратились заслуженный деятель науки РФ, заместитель председателя Правления Российского общества токсикологов, председатель секции лекарственной токсикологии Всероссийской общественной организации токсикологов, член совета по этике Минздрава РФ, член-корреспондент РАМН, доктор медицинских наук, профессор **Гуськова Татьяна Анатольевна**, ответственный секретарь Всероссийской общественной организации токсикологов, профессор **Хамидулина Халидя Хизбулаевна,** главный редактор журнала «Фармация», зав. кафедрой фармакогнозии фармацевтического факультета ГБОУ ВПО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России, член-корреспондент РАМН, доктор фармацевтических наук, профессор **Самылина Ирина Александровна,** зам. директора НИИ фармации по научной работе, доктор фармацевтических наук, доцент **Пятигорская Наталья Валерьевна.**

На конференции были обсуждены различные актуальные аспекты доклинических исследований лекарственных средств, касающиеся их безопасности для человека. Большая часть докладов представлена членами секции лекарственной токсикологии Российского общества токсикологов.

Безопасность лекарственного средства зависит от качественного изучения его на стадии доклинических исследований. Но не меньшее значение имеет экстраполяция на человека данных, полученных в экспериментах на животных. Этому вопросу был посвящен доклад Т.А. Гуськовой и соавт. Авторами была представлена методика определения первой безопасной дозы для человека по результатам изучения общетоксического действия препарата ин виво. Обращено внимание на необходимость учитывать определенные коэффициенты при пересчете доз препарата с каждого вида животных на человека. Во время проведения 1-й фазы клинических исследований оценивается переносимость фармакологического препарата, назначаемого человеку впервые. Поэтому особое внимание должно уделяться выбору начальной дозы препарата. Данная методика соответствует рекомендациям ICH, FDA, EMA. Она впервые включена в Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. В настоящее время в нашей стране ведутся работы по созданию известных лекарственных препаратов в наноформах. В связи с этим большой интерес вызвало сообщение С.Г. Клочкова и соавт. о результатах исследования локализации, динамики накопления и элиминации наночастиц в органах и тканях животных после длительного воздействия. В наноразмерном состоянии многие материалы приобретают новые свойства и становятся биологически активными, что не только открывает новые возможности их использования в области медицины, но и несет потенциальные риски. В частности, установлено, что многие наночастицы легко преодолевают гематоэнцефалический барьер, что может приводить к их накоплению в ткани мозга. Полученный авторами массив данных позволил охарактеризовать распределение ряда наночастиц по органам, тканям и биологическим жидкостям, определить ключевые органы воздействия техногенных наночастиц на организм животных, а также оценить общетоксические свойства наночастиц при их длительной экспозиции. Были обсуждены особенности доклинических токсикологических исследований различных групп препаратов. Так, К.В. Сивак и соавт. представили разработку

методических подходов к доклинической оценке эффективности и безопасности ренопротекторных препаратов, обратив особое внимание на необходимость учитывать механизмы их терапевтического действия. Методические подходы к доклинической оценке безопасности лекарственных средств, рекомендуемых для педиатрии, были отражены в докладе В.В. Бортниковой и соавт. Авторы убедительно показали, что проведение токсикологических исследований на неполовозрелых животных разных возрастных групп позволяет с большей вероятностью спрогнозировать безопасность и переносимость лекарственных средств у детей. Г.Н. Енгалычева и соавт. познакомили слушателей с изменениями, которые были внесены в новое Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Несколько докладов было посвящено различным методам оценки качества лекарственных препаратов, способов определения их в различных средах. Так, в сообщении Ю.В. Медведева и соавт. были представлены способы определения концентрации лекарственных веществ в плазме крови на этапах их разработки, внедрения и применения. И.В. Гравель и соавт. представили современные подходы к фармакопейной оценке содержания мышьяка в лекарственном растительном сырье, что имеет огромное значение для безопасности растительных лекарственных препаратов. В своем выступлении В.И. Будь показал перспективы применения ускорительной масс-спектрометрии в исследованиях биофармацевтических препаратов, таких как белки. Это особенно важно в связи с ростом создания биотехнологических препаратов, для которых рутинные доклинические токсикологические исследования не достаточны при оценке их безопасности для человека. На конференции был затронут вопрос об экологической безопасности окружающей среды и населения в отношении отходов фармацевтических производств. Так, некоторые антибиотики относятся к 1-му и 2-му классу опасности. Накапливаясь в окружающей среде вследствие их медленного разложения, они могут оказывать негативное воздействие на природную среду, а также приводить к образованию новых токсичных соединений. Фактически все отходы предприятия, осуществляющего производство лекарственных препаратов, содержат определенное количество токсикологически опасных веществ. Это относится и к промышленным выбросам предприятия в воздушную среду, и к сточным водам, и к твердым отходам. Авторы считают, что предпринимаемые в настоящее время меры по законодательному обеспечению правил обращения с отходами объектов фармацевтической деятельности не могут быть решены только специалистами природоохранных организаций, не имеющими необходимых знаний о специфике лекарственных препаратов и возможной их деградации в объектах окружающей среды. Авторы делают вывод о том, что необходима разработка гармонизированного научно-методического подхода к определению токсичности и класса опасности твердых отходов фармацевтических предприятий.

По результатам научно-практической конференции её участники отметили необходимость дальнейших исследований в направлении доклинической и клинической оценки безопасности лекарственных средств. В связи с ростом количества биотехнологических препаратов необходимо постоянно совершенствовать рекомендации по изучению всех видов токсичности. Настало время уделить особое внимание гармонизации отечественных требований к доклинической оценке безопасности лекарственных средств с рекомендациями GLP, GCP, GVP, ICH, FDA, EMA.

Председатель секции лекарственной токсикологии Российского общества токсикологов, заслуженный деятель науки РФ, чл.-корр. РАМН, доктор медицинских наук, профессор Т.А. Гуськова

Секретарь секции лекарственной токсикологии Российского общества токсикологов, кандидат фармацевтических наук О.И. Терёшкина

Женевские встречи
К итогам внеочередных и очередных конференций сторон Стокгольмской, Базельской и Роттердамской конвенций

С 28 апреля по 10 мая 2013 года две тысячи участников из 170 стран, в том числе 80 министров из стран-Сторон, собрались в Женеве, чтобы обсудить решения по повесткам дня Конференций сторон трех конвенций, регулирующих экологически безопасное обращение химических веществ и опасных отходов на глобальном уровне (Базельская конвенция о контроле за трансграничной перевозкой опасных отходов и их удалением; Роттердамская конвенция о процедуре предварительного обоснованного согласия в отношении отдельных опасных химических веществ и пестицидов в международной торговле; Стокгольмская конвенция о стойких органических загрязнителях) и их синергии, далее ExCOPs2.

Делегация Российской Федерации была представлена сотрудниками Минприроды России, Минздрава России, Роспотребнадзора и МИД России.

Базельская конвенция о контроле за трансграничной перевозкой опасных отходов и их удалением регулирует экспорт/импорт опасных отходов и отходов, содержащих опасные химические вещества. Конвенция была принята в 1989 году и вступила в силу в 1992 году. В настоящее время она насчитывает 180 стран-Сторон. В Российской Федерации Базельская конвенция ратифицирована в 1994 году Федеральным законом №49-ФЗ от 25 ноября 1994 года «О ратификации Базельской конвенции о контроле за трансграничной перевозкой опасных отходов и их удалением».

Стокгольмская конвенция о стойких органических загрязнителях (СОЗ), 2001 г. Цель Конвенции – ограничение или прекращение производства всех преднамеренно продуцируемых СОЗ. Стокгольмская конвенция в настоящее время регулирует 23 химических органических вещества, являющихся стойкими, токсичными соединениями, способными к переносу на большие расстояния, биоаккумуляции в организмах и накоплению в окружающей среде. Конвенция была принята в 2001 году и вступила в силу в 2004 году. В настоящее время 179 стран являются Сторонами конвенции. Конвенция подписана Россией 22 мая 2002 года (Постановление Правительства Российской Федерации от 18.05.2002 № 320). После нескольких попыток ратифицировать конвенцию в РФ первая попытка ратификации была предпринята 11 октября 2004 года, вторая в 2007 году, но оба раза законопроекты были отклонены), в 2011 году конвенция была ратифицирована Федеральным законом № 164-ФЗ от 27.06.2011 «О ратификации Стокгольмской конвенции о стойких органических загрязнителях». Но данный ФЗ ратифицирует Конвенцию в редакции от 22 мая 2001 года, т.е в той редакции, в которой она и была подписана в 2002 году. При этом Российская Федерация реализовала для себя имеющуюся в тексте Конвенции возможность для государства организовать режим, согласно которому любая новая поправка к приложениям А, В или С Конвенции будет вступать в силу для Российской Федерации лишь после процедуры ратификации, принятия, одобрения или присоединения к такой поправке.

Роттердамская Конвенция о процедуре предварительного обоснованного согласия в отношении отдельных опасных химических веществ и пестицидов в международной торговле, 1998 г. Конвенция дает право каждой стране-участнику самостоятельно решать вопрос о ввозе или запрещении ввоза ряда потенциально опасных веществ на свою территорию, так как химические вещества, включенные в приложение Конвенции, не могут ввозиться в страну без процедуры предварительного обоснованного согласия. В отличие от Стокгольмской конвенции, Роттердамская конвенция не запрещает и не ограничивает торговлю химическими веществами или пестицидами, но служит для усиления защиты здоровья человека и окружающей среды путем расширения обмена критически важной информацией о безопасности между экспортирующими и импортирующими государствами. Роттердамская конвенция в настоящее время регулирует информацию об экспорте/импорте 47 опасных химических веществ, перечисленных в Приложении III Конвенции, 33 из которых являются пестицидами (включая 4 особо опасных пестицидных) и 14 из которых являются промышленными химикатами. Конвенция была принята в 1998 году и вступила в силу в 2004 году. В настоящее время она насчитывает 152 Стороны. В России конвенция ратифицирована в 2011 году Федеральным законом № 30-ФЗ от 08.03.2011 «О присоединении Российской Федерации к Роттердамской конвенции о процедуре предварительного обоснованного согласия в отношении отдельных опасных химических веществ и пестицидов в международной торговле».

Переговоры сторон в Женеве были сосредоточены на ключевых элементах синергетического процесса и совместных действиях в рамках конвенций, совершенствовании взаимодействия и координирования деятельности конвенций и определении конкретных областей деятельности, в которых может быть достигнута синергия. В ходе сессии было принято 50 отдельных решений, направленных на усиление защиты окружающей среды и здоровья человека от опасных химических веществ и отходов, состоялась «ярмарка» Региональных центров, работающих в рамках конвенций, принят ряд общих решений по синергии конвенций.

На ExCOPs2 в течение двух недель проходили объединенные заседания в пленарном режиме, отдельные пленарные заседания по каждой из конвенций, работали контактные и региональные группы по отдельным вопросам повестки дня, проходили параллельные мероприятия, было проведено министерское совещание по теме укрепления взаимодействия между конвенциями на национальном, региональном и глобальном уровнях с участием Исполнительного директора ЮНЕП Ахима Штайнера, Генерального директора Продовольственной и сельскохозяйственной организации ООН (ФАО) Жозе Грациано да

Сильва, Генерального директора и Председателя Глобального экологического фонда ООН (ГЭФ) Наоко Ишии.

Приветствуя делегатов на сессии открытия, Магдалена Балицка (Польша), Президент Совещания сторон Роттердамской конвенции, поблагодарила собравшихся за доверие. Франц Перес (Швейцария), Президент Совещания сторон Базельской конвенции, выразил надежду, что Объединенное совещание сторон трех конвенций умножит успехи предыдущих совещаний.

Исполнительный секретарь Джим Уиллис определил тему совещания как «Устойчивая синергия» и подчеркнул, что одновременное проведение очередных сессий конвенций инновационно и уникально для международной практики управления природоохранной деятельностью. Соисполнительный секретарь Роттердамской конвенции Клейтон Кампанола озвучил обширный список веществ, рассматриваемых для включения в Перечень III Роттердамской конвенции, особо выделил параквat как чрезвычайно опасный пестицид, подлежащий первоочередному включению в указанный Перечень.

Г-жа Ишии подчеркнула важность инструментария ГЭФ для поддержки рационального регулирования химических веществ в национальных программах, создания интегрированной с позиций ГЭФ тематической области по решению проблем химических веществ и отходов, а также для расширения взаимодействия с частным сектором.

Генеральный директор ФАО Жозе Грациано да Сильва говорит о том, что во многих странах интенсивное производство сельскохозяйственных культур привело к истощению природных ресурсов для сельского хозяйства, ставя под угрозу продовольственную безопасность. Он признал, что пестициды по-прежнему представляют серьезную угрозу для здоровья человека и окружающей среды и, в конечном счете, переходят в категорию отходов. Сегодня полмиллиона тонн устаревших пестицидов разбросаны по всему миру, а в развивающихся странах химические средства защиты в сельском хозяйстве продолжают быть востребованными, однако необходимо развивать направление по замене их на альтернативные, экологически безопасные приемы и средства.

На сегодняшний день около 70 процентов химических веществ, включенных в списки Базельской, Роттердамской и Стокгольмской конвенций являются пестицидами, и многие из них продолжают использоваться в сельском хозяйстве. В интересах всех стран – чтобы Базельская, Роттердамская и Стокгольмская конвенции работали вместе, эффективно и рационально, для решения различных аспектов жизненного цикла химических веществ.

Президент Совещания сторон Стокгольмской конвенции Освальдо П. Альварес напомнил, что решение Управляющего совета ЮНЕП призывает стороны обсудить меры по ускорению возможного присоединения Минаматской конвенции по ртути к синергетическим процессам. В свою очередь господин Альварес предложил обсудить дальнейшее сотрудничество с Минаматской конвенцией в контактной группе. Стороны поддержали его.

На заседании Объединенного секретариата был представлен отчет о мерах по развитию синергии. При обсуждении отчета представитель оценочного офиса ЮНЕП отметил, что «незрелость» синергетических процессов представляет определенную проблему. Однако Секретариат сообщил, что 23 страны представили опросные листы, из которых следует, что синергия все же работает и наблюдается прогресс в достижении поставленных целей.

На совещании 28 апреля была сформирована контактная группа по бюджету и синергии, сопредседателями которой стали представители Канады и Чехии. В группе обсуждались вопросы синергии, совместные действия, меры по их координации, программа работы и бюджет совместных действий, а также программа работы и бюджет всех трех конвенций.

В контактной группе представители некоторых развитых и развивающихся стран выразили неудовлетворенность обзором мер по усилению синергии. В итоге группа пришла к соглашению приостановить рассмотрение обзора. Вместо этого в рамках группы были подробно рассмотрены общие рекомендации и конкретные рекомендации сторонам.

По поводу сотрудничества и координации действий на национальном уровне представитель одной из развивающихся стран выразил несогласие с рекомендациями и заявил, что стороны должны (самостоятельно) вырабатывать программу национальных мероприятий по управлению химическими веществами и отходами.

Делегаты также обсудили рекомендацию по финансированию синергетических мероприятий, выработанную в соответствии с принципом общей, но дифференцированной ответственности. Ряд развивающихся стран поддержал эту рекомендацию, подчеркнув важность соответствующей поддержки синергетических процессов. Некоторые развитые страны, сославшись на отдельную главу по финансированию, разрабатываемую контактной группой, не поддержали ссылку на финансирование в рекомендациях. Делегаты согласились рекомендовать поддерживать процессы синергии, в том числе и добровольными взносами. Стороны утвердили программу работы и бюджет индивидуальной и совместной деятельности трех конвенций на 2014–2015 гг., согласились укреплять создание потенциала и технической помощи для заинтересованных стран, используя механизм инвестиции средств, сэкономленных в течение последних двух лет в расширенную программу технической помощи, которая лучше отвечает потребностям развивающихся стран и стран с переходной экономикой. Джим Уиллис, исполнительный секретарь Базельской, Роттердамской и Стокгольмской конвенций подчеркнул, что «В эпоху строгой финансовой экономии мы узнали, как с помощью механизма синергии рационально удовлетворить интересы многих Сторон, находящихся в стесненных экономических обстоятельствах».

Региональные акценты

Бруно Оберле (Швейцария) напомнил, что Минаматская конвенция по ртути будет принята и открыта для подписания в октябре текущего года, и выразил надежду, что ее секретариат станет частью Объединенного Секретариата конвенций.

Представитель Азиатско-Тихоокеанского региона отметил, что открытое (гласное) управление химическими веществами и отходами является важным компонентом развития.

Представители Мексики от имени делегатов из Латинской Америки и Карибской группы (GRULAC) призвали к укреплению региональных центров для поддержания соответствующей деятельности в развивающихся странах.

Ирландия от имени Евросоюза поддержала интегрированный подход к финансированию (УТИЛИЗАЦИИ) химических веществ и отходов и призвала стороны, помимо прочего, согласовать механизмы действия Стокгольмской и Роттердамской конвенций и внести хризотиловый асбест в перечень Роттердамской конвенции.

Представитель Чешской Республики от лица стран Центральной и Восточной Европы высоко оценил потенциал объединенной конференции по решению общих для всех конвенций проблем соответствия, финансирования и содействия в решении технических вопросов.

Что сделано?

Стороны рассмотрели специфические аспекты конвенций – листинг гексабромциклододекана и механизм оценки соответствия по Стокгольмской конвенции; создание руководства по электронным отходам и контроль выполнения инициативы Индонезии и Швейцарии по повышению эффективности по Базельской конвенции; и, наконец, в рамках Роттердамской конвенции – механизм оценки соответствия и внесение в перечни пяти новых веществ.

Формат объединенного совещания Сторон трех химических конвенций дал возможность охватить вопросы, связанные с запретом на производство и использование некоторых химических веществ, руководством по отходам и ответственной торговлей.

В рамках задач по листингу химических веществ и соединений отметим два несомненных успеха. Во-первых, третий из наиболее широко распространенных ингибиторов горения – гексабромциклододекан (ГБЦД) – был включен под юрисдикцию Стокгольмской конвенции с последующим глобальным запретом на его производство и использование. Страны имеют возможность получить специальное исключение на пять лет, позволяющее использовать ГБЦД в теплоизоляции (исключения для пенополистирола и экструдированного пенополистирола в зданиях).

Кроме того, делегаты отклонили предложение разрешить переработку содержащих ГБЦД материалов как практику, запрещенную положениями Конвенции. Иное решение могло бы привести к увеличению периода опасного воздействия СОЗ на окружающую среду и человека на столетие, а по некоторым оценкам – и более.

Во-вторых, листинг ГБЦД в перечне Стокгольмской конвенции предполагает также необходимость для стран-производителей маркировать новые теплоизоляционные материалы, содержащие ГБЦД. Государства-импортеры, в свою очередь, смогут отделять опасные товары и отходы, содержащие это вещество, от других строительных материалов.

При попытке завершить руководство по электронным отходам в рамках Базельской конвенции некоторыми развитыми странами и представителями электронной промышленности были предложены поправки, которые позволяют исключить электронные отходы, подлежащие переработке, из процедур по контролю торговли опасными отходами. Поправки были отклонены, и руководство принято не было, поскольку инициаторы поправок не согласились принять его без предложенных изменений.

Стратегический подход к управлению химическими веществами (SAICM) в итоговых документах Международного семинара по опасным веществам в электронных отходах на протяжении их жизненного цикла, проходившего в Вене в марте 2011 года, и Международной конференции по управлению химическими веществами, состоявшейся в Найроби в сентябре 2012 года, отмечает синергетический потенциал Стокгольмской и Базельской конвенций в решении проблемы утилизации электронных отходов, призывает сформировать международный пул наилучших практик в этой области, расширить ответственность компаний-производителей за утилизацию электронных отходов за счет добровольной реализации производителями принципа take-back – произвел? Забери!.

Следует отметить, что практически все развивающиеся страны сталкиваются с обостряющейся проблемой проникновения на их территории большого количества электронных и электрических отходов, поэтому руководство по электронным отходам им крайне необходимо. Тем не менее, эти страны выступают против поправок, которые позволят сбрасывать отходы под предлогом их возможной переработки.

Делегаты Роттердамской конвенции рассмотрели вопрос о включении шести веществ под юрисдикцию данного соглашения. Известно, что Роттердамская конвенция не запрещает производство и использование веществ, включенных в ее список, но требует от экспортеров информировать страны-импортеры и получать от них разрешение на импорт данных веществ. В ходе дискуссии пента и окта бромированные дифенил эфиры (бромированные пламегасители), перфтороктансульфонат (промышленный химикат) и азинфоз-метил (пестицид) были добавлены в перечень веществ, регулируемых Роттердамской конвенцией.

По вопросу о включении хризотилового асбеста и параквата в список конвенции консенсус достигнут не был. Решение в пользу листинга было заблокировано при активном участии России, Индии, Украины, Казахстана и Кыргызстана, которые в том или ином варианте ссылались на недоказанность опасного воздействия хризотилового асбеста на окружающую среду и здоровье человека.

Представитель Австралии при поддержке делегаций Евросоюза и еще 16 стран заявил, что хризотиловый асбест соответствует всем критериям для включения его в перечень Роттердамской конвенции, что отсрочка с принятием этого решения может дорого обойтись окружающей среде и здоровью людей и призвал стороны, выступающие против листинга хризотилового асбеста, пересмотреть свою позицию.

Однако в четверг 9 мая Президент Совещания сторон Роттердамской конвенции Магдален Балицка заявила о невозможности консенсуса по этому вопросу и его переносе.

Несмотря на то, что совещание не привело к достижению соглашения по поводу процедур оценки соответствия по Стокгольму и Роттердаму, работа была продуктивной. Очередные и внеочередные совещания сторон по Базельской, Роттердамской и Стокгольмской конвенции приняли порядка 40 решений и договорились провести следующий раунд объединенных совещаний сторон в 2015 году без привлечения министров.

Макарова А.С., ведущий научный сотрудник, к.т.н., кафедра ЮНЕСКО «Зеленая химия для устойчивого развития» (Институт химии и проблем устойчивого развития РХТУ им. Д.И. Менделеева)

НЕКРОГ

ШАШКИНА ЛЮДМИЛА ФЕДОРОВНА

9 апреля на 86-м году жизни скончалась Шашкина Людмила Федоровна. Людмила Федоровна родилась 20 августа 1926 года, после окончания Ташкентского медицинского института, аспирантуры в НИИ гигиены труда и профзаболеваний АМН СССР и защиты кандидатской диссертации с 1967 года работала в филиале ВНИХФИ, затем в ВНЦ БАВ в качестве заведующей лаборатории, заведующей отделом, впоследствии – в должности ведущего научного сотрудника, где успешно осуществляла научное руководство и организацию работ по токсикологическому изучению лекарственных препаратов и полупродуктов их производства.

Научные разработки Л.Ф. Шашкиной явились основой для решения проблем создания безопасных условий труда в химико-фармацевтической промышленности, с ее участием подготовлен ряд отраслевых стандартов и методических указаний по гигиеническому нормированию и доклиническому токсикологическому изучению лекарственных препаратов.

Под ее руководством защищены три кандидатские диссертации. В 2000 году Л.Ф. Шашкина защитила докторскую диссертацию. Людмила Федоровна была учителем и наставником целой плеяды токсикологов, продолжающих и развивающих исследования по безопасности лекарственных препаратов.

Мы будем помнить Людмилу Федоровну активной, энергичной, настойчивой, жизнелюбивой. Для нас она останется примером трудолюбия, стойкости и целеустремленности.

Коллектив ВНЦ БАВ,
Всероссийская общественная организация токсикологов, редколлегия журнала «Токсикологический вестник» глубоко скорбит о кончине Шашкиной Людмилы Федоровны и выражают глубокое соболезнование родным и близким.

Бюллетень

Российского регистра потенциально опасных химических и биологических веществ

НОВЫЕ СВЕДЕНИЯ О ТОКСИЧНОСТИ И ОПАСНОСТИ ХИМИЧЕСКИХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ

УДК 615.06 : 615.071

М.В. Бидевкина[1], Е.Б. Гугля[2], Э.Г. Скрябина[2], Н.И. Шеина[2], Н.Г. Иванов[2]

[1] ФБУН «НИИ дезинфектологии Роспотребнадзора»
[2] ГОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова»

Оценка токсичности и характера вредного действия на организм гексаметилентетрамина (уротропина) при ингаляционном воздействии

В воздухе рабочей зоны устанавливали ПДК гексаметилентетрамина с учетом значений Lim_{ac}, Lim_{it} и Z_{cl}, в атмосферном воздухе населенных мест – с использованием расчетных Lim_{ch} и коэффициента запаса. В качестве ПДК гексаметилентетрамина в воздухе рабочей зоны утверждена величина 0,3 мг/м^3 (аэрозоль, класс опасности 2, пометка «требуется защита глаз и кожи»). В атмосферном воздухе населенных мест утверждена ПДК$_{с.с.}$ 0,01 мг/м^3 (рефлекторно-резорбтивное действие, 4-й класс опасности).

Ключевые слова: *токсичность, раздражающее действие, ингаляционное воздействие*

Введение. Гексаметилентетрамин используется в производстве органического синтеза как ускоритель вулканизации каучука, в качестве фунгицида, как ингибитор коррозии, в качестве сырья для взрывчатых веществ (октоген, гексаген), а также как твердое бездымное горючее (твердый спирт).

Гексаметилентетрамин хорошо изучен в токсикологическом отношении. DL_{50} для мышей и крыс составляет 569 мг/кг и 723 мг/кг соответственно [1]. При введении в брюшную полость величины DL_{50} для крыс находятся в диапазоне от 568 до 8300 мг/кг [1, 2]. DL_{50} при нанесении на кожу для мышей превышает 2500 мг/кг. Гексаметилентетрамин обладает раздражающим действием на кожу и слизистые оболочки (Lim_{it} при нанесении на слизистую оболочку глаз кролика и аппликации на кожу равен соответственно 0,5% и 1% (водный раствор). Вещество не проникает в организм через неповрежденную кожу в количествах, вызывающих гибель или симптомы острого отравления, не кумулирует в организме при повторном введении в желудок экспериментальным животным. Установлено сенсибилизирующее действие вещества на белых мышах методом ГЗТ. Индекс реакции составил 14,4% [2].

Данные по мутагенной активности, генеративной токсичности для нескольких поколений, репродуктивной токсичности, канцерогенности, полученные в хронических опытах при внутрижелудочном поступлении формальдегида и гексаметилентетрамина в организм млекопитающих, рассмотрены Restani и Galli [3]. В результате проведенных исследований установлено, что формальдегид, являясь нормальным метаболитом в организме и на низких уровнях, как и гексаметилентетрамин, не представляют мутагенной и канцерогенной опасности. Канцерогенное действие гексаметилентетрамина не подтверждено данными МАИР.

Целью настоящего исследования являлось изучение токсичности, опасности и характера биологического действия гексаметилентетрамина при ингаляционном воздействии с целью обоснования ПДК в воздухе рабочей зоны и атмосферном воздухе населенных мест.

Материалы и методы исследований. Гексаметилентетрамин представляет собой бесцветные (белые) гигроскопические кристаллы или белый кристаллический мало летучий (не пылящий) слеживающийся порошок без запаха. Химическое название по номенклатуре IUPAC: 1,3,5,7-тетраазатрицикло(3.3.1.13,7)декан. Регистрационный номер CAS: 100-97-0. Эмпирическая формула: $(CH_2)_6N_4$. Молекулярная масса: 140,19. $T_{пл.}$: 200^{0}С. $T_{кип.}$: 280^{0}С (с разложением). Легко растворим в воде (1:1,5; 812 мг/л 12°С), растворим в этаноле (1:10), хлороформе, плохо растворим в эфире.

Экспериментальные исследования проведены в соответствии с существующими методическими указаниями [4–6].

Содержание гексаметилентетрамина в воздухе определяли спектрофотометрическим методом. Нижний предел измерения концентрации вещества – 0,12 мг/м^3 (при отборе 200 дм^3 воздуха). Метод селективен в условиях производства гексаметилентетрамина, в присутствии аммиака и формальдегида.

Исследование проведено на 250 белых крысах популяции Вистар и 32 морских свинках альбиносов. Ингаляционные затравки животных проводили в затравочных камерах объемом 200 л динамическим способом. Продолжительность однократной ингаляционной затравки составляла 4 ч.

Для изучения функции нервной системы использовали метод регистрации суммационно-порогового показателя (СПП) и методы оценки поведенческих реакций: «открытое поле», «темная камера с отверстиями» (ТКСО) [7, 8]. Функцию дыхательной системы изучали путем регистрации частоты дыхания с применением датчика для бесконтактной пневмографии, исследовали клеточную реакцию легких и верхних дыхательных путей. Для оценки функции печени в сыворотке крови крыс измеряли активность аланинаминотрансферазы (АлАТ), аспартатаминотрансферазы (АсАТ), щелочной фосфатазы (ЩФ). Кроме того, в сыворотке крови определяли содержание общего белка, альбумина, глюкозы, холестерина, общего билирубина. Функцию почек оценивали по диурезу (мл), количеству общего белка, мочевины, хлоридов и креатинина в моче и сыворотке крови. Исследования проведены на автоматическом анализаторе «Конелаб 30 i» производства Финляндии. В периферической крови определяли концентрацию гемоглобина, количество эритроцитов, среднее содержание гемоглобина в 1 эритроците ($ССГ_1$), индекс красной крови (ИКК). В лейкограмме периферической крови подсчитывали общее количество лейкоцитов и относительное количество лимфоцитов, нейтрофилов, эозинофилов и моноцитов. Для изучения влияния гексаметилентетрамина на иммунную систему в периферической крови белых крыс определяли количество основных популяций лимфоцитов (Т- и В-лимфоцитов). Сенсибилизирующую активность препарата изучали на морских свинках и белых крысах в соответствии с Методическими указаниями [9]. На морских свинках проводили реакцию специфического лизиса лейкоцитов (РСЛЛ) и провокационную капельную пробу. На белых крысах – РСЛЛ и реакцию специфической дегрануляции тучных клеток (РДТК).

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

Результаты и обсуждение. Для определения Lim_{ac} аэрозоля гексаметилентетрамин были испытаны 4 концентрации: 29,1 ± 4,2; 11,7 ± 2,7; 4,6 ± 1,3 и 1,7 ± 0,25 мг/м^3. Размер 53% частиц аэрозоля гексаметилентетрамина не превышал 2 μ. Результаты исследований приведены в таблице 1.

Как следует из представленных данных, аэрозоль гексаметилентетрамина в концентрации на уровне 29,1 мг/м^3 вызывал нарушение функционального состояния дыхательной и нервной систем, характеризующееся снижением частоты дыхания, СПП, изменением поведенческих реакций; зарегистрировано снижение общего билирубина в сыворотке крови и содержания хлоридов в моче.

Воздействие аэрозоля гексаметилентетрамина в концентрации на уровне 11,7 мг/м^3 также вызывало у крыс изменение функционального состояния дыхательной, нервной систем, печени, но менее выраженное. Наряду с урежением частоты дыхания у белых крыс наблюдалось изменение клеточного состава в смывах из назального и бронхоальвеолярного отделов дыхательных путей. В смывах из назального отдела дыхательных путей зарегистрировано повышение общего количества клеток (опыт: 0,41 ± 0,05 x10^6 кл./мл, контр.: 0,28 ± 0,04 x10^6 кл./мл, $p < 0,05$), увеличение относительного и абсолютного количества макрофагов (опыт: 0,10 ± 0,02 x10^6 кл./мл, контр.: 0,04 ± 0,01 x10^6 кл./мл, $p < 0,05$) и снижение относительного числа лимфоцитов (опыт: 21,5± 2,9%, контр.: 32,3 ± 1,8%, $p < 0,05$). В смывах из бронхоальвеолярного отдела наблюдались аналогичные изменения. При исследовании функционального состояния нервной системы у подопытных крыс отмечалось снижение СПП и увеличение горизонтальной подвижности в тесте «открытое поле». В сыворотке крови зарегистрировано снижение содержания общего билирубина. Выявленное увеличение содержания в моче мочевины, находящееся в пределах физиологической нормы, не влияло на функциональную активность почек, которая определялась по стандартному коэффициенту очищения мочи.

Аэрозоль гексаметилентетрамина в концентрации на уровне 4,6 мг/м^3 оказывал раздражающее действие на верхние дыхательные пути, характеризующееся только изменением клеточного состава из назального отдела дыхательных путей крыс: зарегистрировано повышение общего количества клеток (опыт: 0,55 ± 0,06 x10^6 кл./мл, контр.: 0,36 ± 0,09 x10^6 кл./мл, $p < 0,05$), увеличение относительного и абсолютного количества макрофагов (опыт: 0,13 ± 0,02 x 10^6 кл./мл, контр.: 0,04 ± 0,01 x10^6 кл./мл, $p < 0,05$) и снижение относительного числа лимфоцитов (опыт: 20,3 ± 1,3%, контр.: 27,3 ± 2,7%, $p < 0,05$). Концентрация гексаметилентетрамина на уровне 1,7 мг/м^3 не вызывала у подопытных животных каких-либо изменений регистрируемых показателей.

Таким образом, аэрозоль гексаметилентетрамина в наибольшей концентрации (29,1 ± 4,2 мг/м^3) оказывал токсическое действие на организм экспериментальных животных. Порог острого интегрального действия аэрозоля гексаметилентетрамина составил 11,7 ± 2,7 мг/м^3 по изменению функционального состояния дыхательной, нервной системы и печени. Порог раздражающего действия (Lim_{ir}) аэрозоля гексаметилентетрамина установлен на уровне 4,6 ± 1,3 мг/м^3. Зона раздражающего действия вещества составила 4,54, что свидетельствует о том, что гексаметилентетрамин является специфическим раздражающим промышленным веществом. Порог раздражающего действия вещества для человека составил 2,1 ± 0,32 мг/м^3.

Для изучения сенсибилизирующего и иммунотропного действия гексаметилентетрамина белых крыс и морских свинок подвергали ингаляционному воздействию вещества в концентрациях 13,4 ± 2,6 и 5,2 ± 0,9 мг/м^3 в течение двух недель по 4 часа в день. При действии аэрозоля гексаметилентетрамина в концентрации на уровне 13,4 мг/м^3 у 75% морских свинок обнаружены положительные кожные пробы: интенсивность реакции – 2 балла. Постановка РССЛ выявила в опытной группе повышение лизиса лейкоцитов у 80% морских свинок. Показатель РСЛЛ был также выше в опытной группе (опыт: 14,8 ± 3,1, контр.: 3,4 ± 0,09, $p < 0,05$). У белых крыс непосредственно после экспозиции обнаружены изменения в лейкоцитарной формуле: снижение относительного количества лимфоцитов при увеличении числа нейтрофилов (сегментоядерных и палочкоядерных). Снижение общего количества лимфоцитов наблюдалось преимущественно за счет снижения популяции Т-лимфоцитов (опыт: 41,13 ± 0,85%, контр.: 45,5 ± 1,02%, $p < 0,02$). Ингаляция аэрозоля гексаметилентетрамина в концентрации на уровне 5,2 мг/м^3 не выявила сенсибилизацию у морских свинок и белых крыс. Таким образом, Limsens при подостром воздействии установлен на морских свинках на уровне 13,4 мг/м^3. На этом же уровне на белых крысах выявлено иммуннотропное действие гексаметилентетрамина.

Для определения Lim_{ch} белых крыс подвергали круглосуточному ингаляционному воздействию гексаметилентетрамина в двух концентрациях: 2,9 ± 0,36 и 0,75 ± 0,04 мг/м^3. Обследование лабораторных животных проводили 1 раз в сутки. При обнаружении минимальных изменений регистрируемых показателей интоксикации у крыс экспозиция гексаметилентетрамина в данной концентрации заканчивалась. В результате проведенных исследований установлено, что аэрозоль гексаметилентетрамина в концентрации 2,9 ± 0,36 мг/м^3 вызывал изменение показателей интоксикации через 24 ч (нарушение функционального состояния дыхательной, нервной систем и печени), а в концентрации на уровне 0,75 мг/м^3 – через 100 ч (раздражающее действие на дыхательную систему и изменение функции нервной системы). Результаты исследований приведены в таблице 2.

Как следует из представленных данных, частота дыхания крыс под действием обеих испытанных концентраций гексаметилентетрамина не изменялась. Раздражающее действие вещества проявлялось в изменении клеточного состава смывов из верхнего и нижнего отделов дыхательных путей. Через 24 ч ингаляции гексаметилентетрамина в концентрации на уровне 2,9 мг/м^3 в смывах из бронхоальвеолярного отдела наблюдалось повышение общего количества клеток (опыт: 0,48 ± 0,05x10^6 кл./мл, контр.: 0,35 ± 0,04x10^6 кл./мл, $p < 0,05$), увеличение относительного и абсолютного количества макрофагов (опыт: 0,24 ± 0,04x10^6 кл./мл, контр.: 0,15 ± 0,02x10^6 кл./мл, $p < 0,05$) и снижение относительного числа лимфоцитов.

Через 100 ч экспозиции гексаметилентетрамина (концентрация на уровне 0,75 мг/м^3) в смывах из бронхоальвеолярного отдела зарегистрированы аналогичные изменения. В смывах из назального отдела дыхательных путей отмечалось повышение общего количества клеток (опыт: 0,45 ± 0,05x10^6 кл./мл, контр.: 0,30 ± 0,04x10^6 кл./мл, $p < 0,05$) и увеличение относительного числа макрофагов. Нарушение функции нервной системы характеризовалось снижением СПП и повышением двигательной активности крыс в различные сроки наблюдения. Через 24 ч под действием гексаметилентетрамина в концентрации на уровне 2,9 мг/м^3 в сыворотке крови зарегистрировано повышение активности ЩФ и содержания общего билирубина.

Согласно (16), определение порога хронического действия, класса опасности и коэффициента запаса проводили на основании обработки экспериментальных зависимостей «концентрация – время наступления эффекта». Указанные зависимости представляли в двойном логарифмическом масштабе, после чего определяли параметры их линейного приближения графическим и аналитическим методом. Необходимые токсикометрические величины далее рассчитывали и определяли по таблицам, исходя из полученных параметров – угла наклона прямых и экстраполированных значений. В результате проведенного анализа установлены по влиянию на дыхательную систему Lim_{ch} 0,1443 мг/м^3 и коэффициент запаса 15, класс опасности гексаметилентетрамина 4-й.

ПДК гексаметилентетрамина в воздухе рабочей зоны устанавливали с учетом значений Lim_{ac}, Lim_{ir} и Z_{ir}, в атмосферном воздухе населенных мест – с использованием расчетных Lim_{ch} и коэффициента запаса.

Заключение. В качестве ПДК гексаметилентетрамина в воздухе рабочей зоны утверждена величина 0,3 мг/м^3 (аэрозоль, класс опасности 2, пометка «требуется защита глаз и кожи») [11]. В атмосферном воздухе населенных мест утверждены ПДК 0,03/0,01 мг/м^3 (резорбтивное действие, 4-й класс опасности) [12].

Таблица 1

Функциональное состояние крыс после однократного ингаляционного воздействия аэрозоля гексаметилентетрамина в различных концентрациях

Показатели		Группы	Концентрация, мг/м³		
			29,1 ± 4,2	11,7 ± 2,7	4,6 ± 1,3
Частота дыхания/мин.		Опыт	89,5 ± 7,3*	92,4 ± 6,8*	105,4 ± 7,1
		Контр.	106,8 ± 7,5	109,6 ± 6,3	108,7 ± 5,9
СПП, усл. ед.		Опыт	0,65 ± 0,02**	0,68 ± 0,03*	0,71 ± 0,04
		Контр.	0,84 ± 0,05	0,79 ± 0,04	0,71 ± 0,05
ТКСО, кол-во выглядываний		Опыт	17,3 ± 2,8*	14,3 ± 2,5	9,8 ± 2,7
		Контр.	11,6 ± 1,9	12,8 ± 2,1	15,0 ± 2,0
Открытое поле	горизонт. подвижность	Опыт	42,7 ± 4,8*	37,5 ± 2,4*	30,1 ± 1,8
		Контр.	30,6 ± 3,7	28,6 ± 2,7	33,3 ± 4,3
	норки	Опыт	12,3 ± 2,2**	9,4 ± 1,3	6,5 ± 0,4
		Контр.	6,1 ± 0,7	6,8 ± 0,5	5,3 ± 0,7
АлАТ, нмоль/с·л		Опыт	296,8 ± 12,7	310,4 ± 16,3	313,1 ± 20,3
		Контр.	281,3 ± 13,8	319,5 ± 21,4	302,2 ± 10,5
АсАТ, нмоль/с·л		Опыт	405,6 ± 21,7	422,6 ± 18,7	454,3 ± 13,6
		Контр.	416,2 ± 19,8	413,9 ± 23,6	435,5 ± 16,5
Общий билирубин, мкмоль/л		Опыт	8,63±0,39***	9,92±0,41***	11,6 ± 0,45
		Контр.	13,8 ± 0,47	13,0 ± 0,52	12,3 ± 0,55
Белок в моче, ммоль/л		Опыт	1,29 ± 0,46	1,46 ± 0,55	1,23 ± 0,51
		Контр.	1,37 ± 0,39	1,60 ± 0,31	1,35 ± 0,47
Хлориды в моче, ммоль/л		Опыт	36,8 ± 6,2*	48,5 ± 7,9	59,6 ± 7,2
		Контр.	65,7 ± 8,3	62,0 ± 10,7	64,8 ± 7,9
Мочевина в моче, ммоль/л		Опыт	1056 ± 103	1235 ± 112*	986 ± 71,5
		Контр.	968 ± 74,4	933 ± 65,0	973 ± 64,8

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Таблица 2

Функциональное состояние крыс после круглосуточного ингаляционного воздействия аэрозоля гексаметилентетрамина в различных концентрациях

Показатели	Группы	Концентрация, мг/м³; экспозиция, ч	
		2,9±0,36; 24	0,75 ± 0,04; 100
Частота дыхания/мин.	Опыт	105,3 ± 5,2	109,6 ± 6,4
	Контр.	112,4 ± 6,3	107,2 ± 7,6
СПП, усл. ед.	Опыт	0,85 ± 0,07*	0,91 ± 0,06*
	Контр.	1,16 ± 0,08	1,14 ± 0,07
ТКСО, кол-во выглядываний	Опыт	12,4 ± 0,9	11,4 ± 0,7*
	Контр.	10,2 ± 0,8	5,1 ± 0,4
Открытое поле, горизонт. подв.	Опыт	33,6 ± 3,2*	25,4 ± 2,6
	Контр.	22,4 ± 3,5	23,8 ± 2,5
АлАТ, нмоль/с·л	Опыт	254,1 ± 16,2	263,2 ± 18,4
	Контроль	221,5 ± 12,3	243,2 ± 19,7
ЩФ, ЕД/л	Опыт	85,7 ± 5,2*	76,3 ± 3,9
	Контр.	68,3 ± 4,1	71,2 ± 3,1
Общий билирубин, мкмоль/л	Опыт	8,4 ± 0,47*	7,3 ± 0,31
	Контр.	6,6 ± 0,33	6,7 ± 0,46

*$p < 0,05$

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гигиена и санитария. Вып. № 35. – 1970. – С. 115.
2. Материалы по обоснованию ПДК гексаметилентетрамина (уротропина) в воздухе рабочей зоны (С.П. Сергеев и соавт., Кемеровский мед. ин-т, 1989, Архив секции «Промышленная токсикология»).
3. *Restani P, Galli CL.* Oral toxicity of formaldehyde and its derivatives. Crit Rew Toxicol.; 21 (5). 1991. – 315–328.
4. Методические указания к постановке исследований для обоснования санитарных стандартов вредных веществ в воздухе рабочей зоны (№ 2163-80 от 4.04.80). М., 1980. – 20 с.
5. Методические указания к постановке исследований по изучению раздражающих свойств и обоснованию ПДК избирательно действующих раздражающих веществ в воздухе рабочей зоны. (№ 2196-80). – М.: МЗ РФ, 1980.
6. Временные методические указания по обоснованию предельно допустимых концентраций (ПДК) загрязняющих веществ в атмосферном воздухе населенных мест. (№ 4681-88). – М., 1989. – 110 с.
7. *Сперанский С.В.* Определение суммационно-порогового показателя (СПП) при различных формах токсикологического эксперимента. Методические рекомендации. Новосибирск, 1975. – С. 6–14.
8. Методические рекомендации по использованию поведенческих реакций животных в токсикологических исследованиях для целей гигиенического нормирования. №2166-80 от 14.04.80. Киев, 1980. – 47 с.
9. Требования к постановке экспериментальных исследований по обоснованию предельно допустимых концентраций промышленных аллергенов в воздухе рабочей зоны и атмосферы (МУ № 1.1.578-96 от 21.10.96). М., 1996. – 24 с.
10. Методические указания по обоснованию предельно допустимых концентраций (ПДК) загрязняющих веществ в атмосферном воздухе. М., 2008. – Проект.
11. Предельно допустимые концентрации (ПДК) вредных веществ в воздухе рабочей зоны. Дополнение 6 к ГН 2.2.5.1313-03. ГН 2.2.5.2730-10. – М.: ФЦГиЭ Роспотребнадзора, 2011.- 5 с.
12. Предельно допустимые концентрации (ПДК) загрязняющих веществ в атмосферном воздухе населенных мест. Дополнение 7 к ГН 2.1.6.1338-03. ГН 2.1.6.2498-09. – М.: ФЦГиЭ Роспотребнадзора, 2009.- 7 с.

M.V. Bidevkina[1], Ye. B.Guglya[2], E.G. Skryabina[2], N.I. Sheina[2], N.G. Ivanov[2]

Assessment of toxicity and character of the hexamethylenetetramine (methenamine) adverse effect on the organism at inhalation exposure

[1]Research Institute of Disinfectology, Rospotrebnadzor
[2] N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow

The MAC of hexamethylenetetramine in the workplace was established taking into account values of Lim_{ac}, Lim_{it}, Z_{it}, in ambient air of residential settings using estimated Lim_{ac} and assurance factor. The value of 0.3 mg/m³ is adopted for MAC of hexamethylenetetramine in occupational air (aerosol, hazard class 2, note «protection of eyes and skin is required»). In the ambient air of residential settlements, the MAC magnitude of 0.01 mg/m³ is approved (reflex and reabsorption action, hazard class 4).

Материал поступил в редакцию 12.10.2012 г.

УДК 547-3 : 615.06

Определение характера избирательного действия на организм пиритион цинка при ингаляции

М.В. Бидевкина[1], М.И. Голубева[2], Н.Г. Иванов[3], Е.В. Буданова[3]

[1]ФБУН НИИ Дезинфектологии Роспотребнадзора
[2]ОАО Всероссийский научный центр
по безопасности биологически активных веществ
[3]Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова

Пиритион цинка при ингаляционном воздействии на организм в минимально эффективных концентрациях оказывает преимущественное влияние на функцию нервной и дыхательной системы. В качестве ОБУВ пиритион цинка в воздухе рабочей зоны утвержден 0,2 мг/м³ (аэрозоль), в атмосферном воздухе населенных мест – 0,01 мг/м³.

***Ключевые слова**: пиритион цинка, токсичность, ингаляция*

Введение. Пиритион цинка является дерматотропным средством, относится к подгруппе средств, защищающих кожу от микробных и паразитарных поражений. Пиритион цинка входит в состав многих шампуней против перхоти, аэрозолей и кремов для наружного применения. Препарат депонируется в глубоких слоях эпидермиса и поверхностных слоях дермы. Системная абсорбция происходит медленно и в незначительных количествах.

Фармакологическое действие: противомикробное, бактериостатическое, противогрибковое, фунгистатическое, противосеборейное, противопсориатическое. Препарат обладает выраженной гидратирующей активностью. Пиритион цинк снижает внутриклеточный уровень АТФ, способствует деполяризации клеточных мембран, вызывая гибель грибов и бактерий [1, 2].

Пиритион цинка при введении в желудок относится к умеренно опасным веществам по классификации по ГОСТ 12.1.007-76. DL_{50} для мышей составляет 160 мг/кг, для крыс – 177–269 мг/кг, для собак – 600 мг/кг, для морских свинок – более 2000 мг/кг [3–5]. Данные о токсичности пиритион цинка при нанесении на кожу различны и составляют для кроликов 100 мг/кг и более 2000 мг/кг [6]. Средство умеренно токсично при внутрибрюшинном поступлении (DL_{50} для мышей составляет 26,8 мг/кг) и малотоксично при введении под кожу (DL_{50} для мышей 730 мг/кг) по К.К. Сидорову (1973 г.) [3, 7]. Пиритион цинка является опасным веществом при ингаляционном воздействии: CL_{50} для крыс составляет 140–610 мг/м³ [8].

Пиритион цинка обладает раздражающим действием на кожу и слизистые оболочки глаз, кумулятивной, сенсибилизирующей активностью, фототоксичностью. При поступлении внутрь вызывает раздражение желудочно-кишечного тракта, атрофию скелетных мышц (вплоть до паралича), снижение массы тела, изменение периферического состава крови, сетчатки глаза, функционального состояния центральной нервной системы, почек, а также легких при ингаляционном воздействии.

Пиритион цинка обладает тератогенной и эмбриотоксической активностью, оказывает неблагоприятное влияние на репродуктивную функцию самок. Мутагенное действие пиритиона цинка не обнаружено.

Препараты, содержащие пиритион цинка в количестве 10% и более, считаются опасными. Пиритион цинка и его метаболиты опасны для рыб, гидробионтов, водорослей, для широкого круга микроорганизмов, включая бактерии и грибы, обладают фитотоксичностью [9, 10].

Настоящее исследование проведено *с целью* изучения токсичности, опасности и характера биологического действия пиритион цинка при ингаляционном воздействии для обоснования ОБУВ в воздухе рабочей зоны и атмосферном воздухе населенных мест.

Материалы и методы исследования. Пиритион цинк представляет собой белый или почти белый кристаллический мелкодисперсный (не > 60 мкм) порошок без запаха (или с легким запахом амина). Химическое название по номенклатуре IUPAC: 1-пиридинтиол-1-оксид, цинка соль. Регистрационный № CAS: 13463-41-7. Эмпирическая формула: $C_{10}H_8N_2O_2S_2Zn$. Молекулярная масса: 317,68, $T_{пл}$: 276[0]C, Плотность: 1,78 г/см³. Хорошо растворим в спирте метиловом, растворим в хлороформе, умеренно растворим в спирте этиловом 95%-ном (0,031%) и изопропиловом, практически нерастворим в гексане, ацетоне и воде.

Экспериментальные исследования проведены в соответствии с существующими методическими указаниями на нелинейных белых мышах, крысах, кроликах породы шиншилла [11–15]. Животные содержались на стандартном пищевом рационе. Статистические группы животных состояли из 6–10 особей.

Ингаляционные затравки животных проводили в затравочных камерах объемом 200 литров динамическим способом. Методы исследования функций органов и систем подопытных животных выбирали с учетом данных литературы о биологическом действии изучаемого препарата. В первую очередь изучали антимикробное действие пиритиона цинка, которое оценивалось через 24 ч после однократного ингаляционного воздействия по количественному и качественному составу микрофлоры толстой кишки белых крыс. В качестве показателя раздражающего действия препарата регистрировали частоту дыхания. Исследовали функцию нервной системы (по СПП и поведенческим реакциям: методы «открытого поля» и «темной камеры с отверстиями»), почек (по суточному количеству мочи, содержанию общего белка и хлоридов в ней, содержанию мочевины в моче и сыворотке крови), печени (по активности в сыворотке крови аминотрансфераз, щелочной фосфатазы; содержанию гиппуровой кислоты в моче).

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили методом пробит-анализа по критерию t-Стьюдента. Разницу между контролем и опытом считали статистически значимой при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение. Проведенные исследования показали, что при введении в желудок DL_{50} пиритион цинка для мышей составляет 258,3 ± 17,8 мг/кг (3-й класс опасности по классификации ГОСТ 12.1.007-76), вещество не проникает в организм через неповрежденную кожу в количествах, вызывающих гибель или симптомы острого отравления. Пиритион цинка обладает выраженным раздражающим действием на слизистые оболочки, не раздражает кожу, умеренно кумулирует в организме при повторном введении в желудок: C_{cum} для мышей составил 4,57. Сенсибилизирующая активность пиритион цинка методом воспроизведения гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) на мышах не выявлена.

Для определения Lim_{ac} аэрозоля пиритион цинка белые крысы (по 8 особей в группе) подвергались ингаляционному воздействию вещества в трех концентрациях: 19,6 ± 2,8; 3,2 ± 0,45 и 1,3 ± 0,05 мг/м³. Результаты исследования микрофлоры кишечника крыс представлены в таблице 1.

Как следует из приведенного материала, при ингаляционном воздействии пиритион цинка в концентрации на уровне 19,6 мг/м³ зарегистрировано незначительное изменение микрофлоры кишечника крыс в опытной группе по сравнению с контролем. Установлена 100%-ная высеваемость кишечных палочек с нормальной ферментативной активностью в контрольной группе и 87,5% – в опытной (у 7 крыс из 8). Количество нормальных кишечных палочек у опытных крыс было практически равным и составляло более 8 lg КОЕ/г, в контроле колебалось от 5,8 до 8,3 lg КОЕ/г. Кишечные палочки с измененными свойствами в контроле высевались у трех, в опыте – у одного животного. Условно-патогенные энтеробактерии (протеи) выделены только у одной крысы из контрольной группы в концентрации 5,0 lg КОЕ/г. Псевдомонады не высевались из фекалий крыс обеих групп. Стафилококки в опытной группе высевались реже – только у 37,5% животных (в контроле у 87,5% крыс), поэтому средние арифметические показатели концентрации стафилококков в опытной группе были значительно ниже, чем в контроле – 2,2 и 5,02 lg КОЕ/г соответственно. Абсолютные значения количества стафилококков в обеих группах были аналогичными. Количество энтерококков, лактобацилл и бифидобактерий в среднем также отличалось незначительно в опытной и контрольной группах. При этом бифидобактерии и лактобациллы высевались в обеих группах в 100% и в высоких концентрациях. Следует отметить, что клостридии не были выделены в контрольной группе и высевались в 100% у опытной группы в количестве 1,0–3,0 lg КОЕ/г. Высеваемость кандид в контроле была выше и составила 62,5%, в опыте – 25%, но количество их в абсолютных показателях было практически равным.

Таким образом, при однократном ингаляционном воздействии на организм пиритион цинка не отмечается достоверных изменений со стороны нормальной микрофлоры кишечника крыс. Обращает на себя внимание снижение высеваемости стафилококков и грибов рода *Candida,* что может быть связано с антимикробным эффектом данного препарата. Выделение клостридий у животных опытной группы происходит, вероятно, компенсаторно. Выявленные отклонения позволяют считать, что аэрозоль пиритион цинка в концентрации на уровне 19,6 мг/м³ оказывает слабо выраженное влияние на микрофлору кишечника подопытных животных.

Аэрозоль пиритион цинка в концентрации 3,2 ± 0,45 мг/м³ не вызывал изменения состава микрофлоры кишечника крыс и ее количественных показателей.

При ингаляционном воздействии пиритион цинка у белых крыс кроме исследования микрофлоры толстой кишки оценивали функциональное состояние дыхательной, нервной системы, печени, почек и др. Выявленные изменения регистрируемых показателей приведены в таблице 2.

Как следует из представленных данных, аэрозоль пиритион цинка в концентрации на уровне 19,6 мг/м³ вызывал снижение частоты дыхания, свидетельствующее о раздражающем действии вещества на дыхательную систему экспериментальных животных при ингаляции. На этом уровне воздействия у подопытных крыс выявлено выраженное нарушение функции нервной системы, характеризующееся снижением СПП и заторможенностью животных, вплоть до полного отсутствия ориентировочно-исследовательского рефлекса у белых крыс. Показатели, отражающие функцию печени, почек, периферического состава крови подопытных крыс, не изменялись. Пиритион цинка в концентрации 3,2 ± 0,45 мг/м³ вызывал урежение частоты дыхания и изменение поведенческих реакций. У белых крыс зарегистрировано снижение горизонтальной двигательной активности и количества заглядываний в отверстия-«норки» в тесте «открытое поле» и увеличение латентного периода первого выглядывания в тесте «ТКСО».

Ингаляционное воздействие аэрозоля пиритиона цинка в концентрации 1,3 ± 0,05 мг/м³ не вызывало каких-либо изменений регистрируемых показателей интоксикации у подопытных животных.

Таким образом, пиритион цинка в концентрации 19,6 ± 2,8 мг/м³ оказывал на организм слабое антимикробное, умеренное раздражающее действие и выраженное влияние на функцию нервной системы. Порог острого ингаляционного действия аэрозоля пиритион цинка установлен на уровне 3,2 мг/м³ по изменению функционального состояния нервной и дыхательной системы. Из полученных данных следует, что пиритион цинка обладает неизбирательным раздражающим действием.

Гигиенические нормативы пиритион цинка установлены с учетом параметров токсикометрии и агрегатного состояния вещества в воздухе.

Заключение. Пиритион цинка при ингаляционном воздействии на организм в минимально эффективных концентрациях оказывает преимущественное влияние на функцию нервной и дыхательной системы. В качестве ОБУВ пиритион цинка в воздухе рабочей зоны рекомендован 0,2 мг/м³ (аэрозоль), в атмосферном воздухе населенных мест – 0,01 мг/м³.

Таблица 1

Частота высеваемости и количество представителей нормальной микрофлоры кишечника (lg КОЕ/г фекалий) крыс после однократного ингаляционного воздействия пиритион цинка в концентрации 19,6± 2,8 мг/м3

Группа	M±m, n*	E.coli.		Протеи	Стафилококки	Энтерококки	Лактобациллы	Бифидобактерии	Клостридии	Грибы рода Candida
		Лактозопозитивные	Слабоферментиров.							
Опыт	n	7	1	–	3	7	8	8	8	2
	M±m	7,25± 1,05	0,78± 0,78	0	2,20± 1,11	5,34± 0,82	8,27± 0,52	10,3± 0,25	2,25± 0,37	1,70± 1,12
Контроль	n	8	3	1	7	8	8	8	0	5
	M±m	7,34± 0,34	2,24± 1,12	5,0 (M)	5,02± 0,79	6,21± 0,24	8,63± 1,1	9,62± 0,46	–	3,55± 1,08

n* – количество животных, у которых обнаружены микроорганизмы.

Таблица 2

Частота дыхания и функциональное состояние нервной системы крыс при однократном ингаляционном воздействии пиритион цинка в различных концентрациях

Показатели		Группы	Концентрация, мг/м³		
			19,6 ± 2,8	3,2 ± 0,45	1,3 ± 0,05
Частота дыхания		Опыт Контроль	81,3 ± 3,9*** 108,4 ± 4,9	87,9 ± 6,2* 106,5 ± 5,7	107,8 ± 5,9 109,2 ± 6,8
СПП, усл. ед.		Опыт Контроль	0,84 ± 0,04* 0,98 ± 0,04	1,0 ± 0,05 1,1 ± 0,04	0,96 ± 0,04 0,99 ± 0,05
Открытое поле	горизонтальная подвижность	Опыт Контроль	4,1± 2,45** 26,0 ± 4,9	16,5 ± 1,8* 24,6 ± 3,9	32,1 ± 4,5 29,4 ± 4,2
	вертикальная подвижность	Опыт Контроль	1,25 ± 0,98* 6,0 ± 1,5	5,7 ± 1,1 6,4 ± 1,3	9,2 ± 2,1 8,3 ± 1,6
	норки	Опыт Контроль	0,75±0,16*** 5,25 ± 1,0	3,2 ± 0,4* 5,7 ± 0,9	6,1 ± 0,8 5,4 ± 0,9
ТКСО	латентный период, сек.	Опыт Контроль	>180 *** 53,4 ± 7,6	121 ± 35,8* 62,4 ± 8,3	49,6 ± 7,5 43,8 ± 6,5
	количество выглядываний	Опыт Контроль	0 *** 6,75 ± 1,5	6,3 ± 1,8 7,2 ± 1,6	7,9 ± 1,6 8,1 ± 1,7

*p < 0,05, **p < 0,002, ***p < 0,001.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Регистр лекарственных средств России. Энциклопедия лекарств. Вып. 15. М.: «РЛС-2007». – 2006. – С. 700, 954.
2. Регистр лекарственных средств России. Энциклопедия лекарств. Вып. 16. М.: «РЛС-2008». – 2007. – С. 712, 811, 948–949.
3. Clinical Toxicology. –1978. – Vol. 13. – P. 1.
4. Toxicology Annual. – 1979. Vol. 3. –P. 1.
5. Toxicology and Applied Pharmacology. Pg. 269. – 1966. – Vol. 9. – P.269
6. Yakkyoku. Pharmacy. – 1981. – Vol. 32. – P. 965.
7. Oyo Yakuri. Pharmacometrics. – 1974. –Vol. 8. – P. 1067.
8. National Technical Information Service. Vol. OTS0527753-1.
9. Национальный регистр сельскохозяйственных и ветеринарных химических веществ. Канберра. Австралия. 2001.
10. MSDS (Карта безопасности) / Пиритион цинк, 48% водная дисперсия. Sciens Lab/ Com. Chemical & Lab. Equipment.
11. Методические указания к постановке исследований для обоснования санитарных стандартов вредных веществ в воздухе рабочей зоны. № 2163-80 от 4.04.80. – М., 1980. – 20 с.
12. Методические указания к постановке исследований по изучению раздражающих свойств и обоснованию ПДК избирательно действующих раздражающих веществ в воздухе рабочей зоны. (№ 2196-80). – М.: МЗ РФ, 1980.
13. Требования к постановке экспериментальных исследований по обоснованию предельно допустимых концентраций промышленных аллергенов в воздухе рабочей зоны и атмосферы (МУ № 1.1.578-96 от 21.10.96). – М., 1996. – 24с.
14. Методические указания по установлению ориентировочных безопасных уровней воздействия вредных веществ в воздухе рабочей зоны (№ 4000-85 от 4.11.85). – М., 1985. – 34 с.
15. Методические указания по установлению ориентировочных безопасных уровней воздействия (ОБУВ) загрязняющих веществ в атмосферном воздухе населенных мест (№ 2630-82-88). – М., 1988.
16. Ориентировочные безопасные уровни воздействия (ОБУВ) загрязняющих веществ в атмосферном воздухе населенных мест. Дополнение 5 к ГН 2.1.6.2309-07. ГН 2.1.6.2577-10. – М.:ФЦГЭ Роспотребнадзора, 2010.- 8 с.

M.V.Bidevkina[1], M.I.Golubeva[2], N.G.Ivanov[2], Ye.V.Budanova[3]

Determination of the character of the zinc pyrithione selective action on the organism at inhalation

[1] Research Institute of Disinfectology, Rospotrebnadzor
[2] All-Russian Scientific Center for Safety of Biologically Active Substances.
[3] N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow

The inhalation exposure of the organism to zinc pyrithione at minimal effective concentrations predominantly affects the nervous and respiratory systems functions. The TSEL of zinc pyrithione in occupational air is recommended as 0.2 mg/m^3 (aerosol) and in the ambient air of residential settlements as 0.01 mg/m^3.

Материал поступил в редакцию 08.02.2013 г.

НОВЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТОКСИКОЛОГИИ И СМЕЖНЫМ ДИСЦИПЛИНАМ

- *Бобович Б.Б.*
Управление отходами.
Издательство: М.: - Форум, 2013, – 88с.

- *Коробкин В.И., Передельский Л.В.*
Экология: учебник для вузов. - Изд. 18-е, доп. и перераб. Издательство: - Феникс, РнД , 2012, 601с.

- *Смирнов С.В.*
Основные направления обеспечения гигиенической безопасности труда на территории Самарской области.
Автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора медицинских наук, М., 2013, – 45 с.

- *Унгуряну Т.Н.*
Методические проблемы оценки и управления многосредовым риском здоровью населения в городе с развитой целлюлозно-бумажной промышленностью.
Автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора медицинских наук М., 2013.42 с.

- *Харкевич Д.А.* **Фармакология**
Издательство: - ГЭОТАР-Медиа, 2013, – 760с.

- State of the Science
of **ENDOCRINE DISRUPTING CHEMICALS** -2012
Edited by Ake Bergman, Jerrjld J. Heindel, Susan Jobling, Karen A.Kidd and R.Thomas Zoeller
UNEPand WHO, 2013, – 260 с.

ИНФОРМАЦИЯ О IV СЪЕЗДЕ ТОКСИКОЛОГОВ РОССИИ

В соответствии с планом основных организационных мероприятий Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека на 2013 год и приказом Руководителя Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Г.Г. Онищенко от 16.05.2013 № 324 6–8 ноября 2013 г. в Москве будет проведен **IV Съезд токсикологов России** (далее – Съезд) с международным участием (планируется участие Европейского отделения бюро ВОЗ и Американского токсикологического общества).

Организаторы: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, ФБУЗ «Российский регистр потенциально опасных химических и биологических веществ» Роспотребнадзора, Всероссийская общественная организация токсикологов при поддержке ФГУП «Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России, ФГБУН «Институт токсикологии» ФМБА России, ФГУП НПЦ «Фармзащита» ФМБА России.

Состав организационного комитета IV Съезда токсикологов России с международным участием

Председатель:	
Онищенко Геннадий Григорьевич	Руководитель Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
Заместители председателя:	
Попова Анна Юрьевна	Заместитель руководителя Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителейи благополучия человека
Курляндский Борис Аронович	Председатель правления Всероссийской общественной организации токсикологов, член-корреспондент РАМН (по согласованию)
Лужников Евгений Алексеевич	Руководитель Московского центра острых отравлений НИИ скорой помощи имени Н.В. Склифосовского, заведующий кафедрой клинической токсикологии РМАПО, академик РАМН (по согласованию)
Члены оргкомитета:	
Аксенова Ольга Ивановна	Начальник Управления санитарного надзора Роспотребнадзора
Бонитенко Евгений Юрьевич	Директор ФГУН «Институт токсикологии» ФМБА России (по согласованию)
Верещагин Александр Игоревич	Главный врач ФБУЗ «Федеральный центр гигиены и эпидемиологии» Роспотребнадзора
Гребенюк Александр Николаевич	Главный токсиколог-радиолог Минобороны России, начальник кафедры военной токсикологии Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова (по согласованию)
Гуськова Татьяна Анатольевна	Заведующая лабораторией ФГБУ «НЦ Институт иммунологии» ФМБА России, член-корреспондент РАМН (по согласованию)
Завьялов Николай Всеволодович	Заведующий отделением профилактической токсикологии ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в г. Москве» Роспотребнадзора

Зайцева Нина Владимировна	Директор ФБУН «ФНЦ медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения» Роспотребнадзора, академик РАМН
Кацнельсон Борис Александрович	Руководитель отдела токсикологии и биопрофилактики ФБУН «Екатеринбургский медицинский научный центр профилактики и охраны здоровья рабочих промпредприятий» Роспотребнадзора
Мустафина Илина Закарияновна	Начальник отдела гигиенического научного обеспечения службы Управления научного обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения и международной деятельности Роспотребнадзора
Остапенко Юрий Николаевич	Директор ФГУ «Научно-практический токсикологический центр» ФМБА России (по согласованию)
Ракитский Валерий Николаевич	Заместитель директора ФБУН «Федеральный научный центр гигиены им. Ф.Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора, академик РАМН
Рембовский Владимир Романович	Директор ФГУП «НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России (по согласованию)
Софронов Генрих Александрович	Директор НИИ экспериментальной медицины Северо-Западного отделения РАМН, академик РАМН (по согласованию)
Тутельян Виктор Александрович	Директор ФГБУ «НИИ питания» РАМН академик РАМН (по согласованию)
Филатов Борис Николаевич	Директор ФГУП «НИИ гигиены, токсикологии и профпатологии» ФМБА России (по согласованию)
Филенко Олег Федорович	Профессор кафедры гидробиологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова (по согласованию)
Хамидулина Халидя Хизбулаевна	Директор ФБУЗ «Российский регистр потенциально опасных химических и биологических веществ» Роспотребнадзора
Шандала Михаил Георгиевич	Главный научный сотрудник ФБУН «НИИ дезинфектологии» Роспотребнадзора, академик РАМН
Шестопалов Николай Владимирович	Директор ФБУН «НИИ дезинфектологии» Роспотребнадзора
Шилов Виктор Васильевич	Директор ФБУН «Северо-Западный научный центр гигиены и общественного здоровья» Роспотребнадзора
Технический секретариат съезда:	
Дорофеева Екатерина Валентиновна	Начальник информационно-аналитического отдела ФБУЗ «Российский регистр потенциально опасных химических и биологических веществ» Роспотребнадзора

Перечень основных вопросов, планируемых для рассмотрения на IV Съезде токсикологов России

1. Итоги развития токсикологии в России, ее роль и задачи в охране здоровья населения и защите окружающей среды в связи с вступлением РФ в ВТО и присоединением к ОЭСР.
2. Методология идентификации риска при токсических воздействиях и ее значение в деятельности органов здравоохранения.
3. Проблемы оценки опасности, классификации и государственной регистрации химических веществ и их смесей.
4. Основные проблемы клинической и лекарственной токсикологии.
5. Токсикология экосистем и биологический мониторинг.
6. Информационная токсикология как ведущее направление в области химической безопасности.
7. Особенности токсикологии химикатов, разработанных на основе нано-, био- и клеточных технологий.
8. Влияние токсикантов на органы и системы (нейро-, иммуно-, аллерго-, гепато-, генотоксичность, влияние на репродуктивную и эндокринную системы).
9. Актуальные вопросы военной и экстремальной токсикологии. Токсикологические проблемы химического терроризма. Проблемы, связанные с уничтожением химического оружия.
10. Перспективные направления разработки антидотов, средств патогенетической и симптоматической терапии острых отравлений.
11. Проблемы профессиональной подготовки токсикологов.
12. Межотраслевая и внутриведомственная координация научных исследований и практических работ в области токсикологии.

Научная программа IV Съезда токсикологов России включает в себя

– проведение пленарных и секционных заседаний;
– презентацию стендовых докладов;
– проведение конкурса «Лучшая работа молодого ученого».

Порядок участия в IV Съезде токсикологов России

Форма участия – очная:
– участие с докладом;
– участие со стендовым докладом;
– участие с публикацией(ми), но без доклада;
– участие без публикации и доклада;

Для участия в Съезде необходимо заполнить Регистрационную анкету (Приложение № 1) и **не позднее 1 сентября 2013 года** направить ее по адресу: 117105, г. Москва, Варшавское шоссе, 19А, ФБУЗ «Российский регистр потенциально опасных химических и биологических веществ» Роспотребнадзора, или по факсу +7 (499) 940-9775, или по электронной почте secretary@rpohv.ru в Оргкомитет Съезда.

Статьи, оформленные в соответствии с требованиями, указанными в Приложении № 2, необходимо направить **строго до 1 сентября 2013 года.**

Планируется размещение сборника тезисов в РИНЦ.

В рамках Съезда будет проведен конкурс «Лучшая работа молодого ученого». Требования к участникам указаны в Приложении № 3.

Регистрационный взнос на участие в IV Съезде токсикологов России

Регистрационный взнос оплачивается в размере 100% предварительной оплаты.

<table>
<tr><td>Регистрационный взнос на одного человека составляет при очной форме участия 3000 рублей (в том числе НДС 18%).</td><td rowspan="3">В стоимость регистрационного взноса входит публикация одной статьи (тезисов).</td><td rowspan="4">Дает право на участие во всех официальных мероприятиях IV Съезда токсикологов России 6–8 ноября
2013 г. и на получение портфеля с пакетом документов.</td></tr>
<tr><td>Регистрационный взнос для ординаторов, интернов и студентов составляет 1500 рублей (в том числе НДС 18%).</td></tr>
<tr><td>Регистрационный взнос на одного человека при очной форме участия без публикации и докладов составляет 2000 рублей (в том числе НДС 18%).</td></tr>
<tr><td colspan="2">Дополнительные статьи (тезисы) оплачиваются отдельно из расчета 1150 руб. (в том числе НДС 18 %) за публикацию.</td></tr>
<tr><td colspan="3">При участии только в форме публикации плата составляет 1150 руб. (в том числе НДС 18 %) за одну статью (тезисы). В этом случае после окончания съезда участнику будет выслан сборник тезисов (материалов) бандеролью по почте на адрес, указанный в регистрационной анкете.</td></tr>
<tr><td colspan="3">Фуршет и культурная программа не входят в стоимость регистрационного взноса.</td></tr>
</table>

Приложение № 1
Направить не позднее 1 сентября 2013 года

РЕГИСТРАЦИОННАЯ АНКЕТА
участника IV Съезда токсикологов России с международным участием
г. Москва, 6–8 ноября 2013 г.

1.	Фамилия	
2.	Имя	
3.	Отчество	
4.	Место работы	
5.	Должность (в том числе ординатор, интерн, студент и т.п.)	
6.	Ученая степень	
7.	Ученое звание	
8.	Адрес для контактов (индекс, область, город, улица, дом)	
9.	Телефон раб. (с кодом города)	
10.	Телефон дом. (по желанию)	
11.	Телефон сотовый	
12.	Факс	
13.	E-mail	
14.	Если оплата за участие в Съезде (или печать тезисов) производится **от физического лица,** то указываются следующие данные:	
14.1	Адрес по прописке (индекс, область, город, улица, дом, квартира)	
14.2	Паспортные данные (серия, номер, кем выдан, дата выдачи)	
15.	Если оплата за участие в Съезде (или печать тезисов) производится от **юридического лица,** предоставляется «карта партнера» и указываются следующие данные:	
15.1	Наименование организации (полное и краткое)	

15.2	Юридический адрес (индекс, область, город, улица, дом)		
15.3	Почтовый адрес (индекс, область, город, улица, дом)		
15.4	ИНН/КПП		
16.	Форма участия в Съезде:		
16.1	Участие с устным докладом (название тезисов)		
16.2	Участие со стендовым докладом (название тезисов)		
16.3	Участие с публикацией(ми), но без доклада (название тезисов)		
16.4	Участие без доклада и публикации		
17.	Необходимость мультимедийного проектора	ДА НЕТ (подчеркнуть)	
18.	Потребность в гостинице	ДА НЕТ (подчеркнуть)	
20.	Категория номеров	Одноместный Дельта (****)	да / нет
		Двухместный Гамма (***) Двухместный Дельта (****)	да / нет да / нет
		Место при двухместном проживании Гамма (***) Дельта (****)	да / нет да / нет
21.	Срок проживания	с ____по ___ноября 2013 г. (количество ночей)	
22.	Форма оплаты проживания	Наличный Безналиный (подчеркнуть)	
23.	Завтрак (ориентировочная стоимость - 230 рубл.)	ДА НЕТ (подчеркнуть)	
	Обед (ориентировочная стоимость - 250 рубл.)	ДА НЕТ (подчеркнуть)	
	Ужин (ориентировочная стоимость - 300 - 350 рубл.)	ДА НЕТ (подчеркнуть)	
24.	Участие в фуршете (ориентировочная стоимость на человека 1500 руб.)	ДА НЕТ (подчеркнуть)	

Напоминаем Вам, что счет на оплату для участия в Съезде высылается участнику факсом и/или электронной почтой после получения Оргкомитетом Съезда заполненной Вами регистрационной анкеты и договора (в случае необходимости) (форма договора размещена на сайте Организатора (ФБУЗ «Российский регистр потенциально опасных химических и биологических веществ» Роспотребнадзора) – www.rpohv.ru).

Оплата за участие в Съезде должна быть произведена заранее, путем перечисления денежных средств на расчетный счет Организатора до 15.10.2013 г. Образец заполнения платежного поручения смотрите в счете на оплату.

Сканированная копия документа об оплате регистрационного взноса (платежное поручение или банковская квитанция) должны быть направлены **не позднее 15.10.2013** в адрес Оргкомитета Съезда по e-mail: secretary@rpohv.ru

ПРИМЕЧАНИЕ: Информацию по поступлению денежных средств на расчетный счет Оргкомитета Съезда можно получить по телефону: 8 (499) 940-97-87 (контактное лицо – Гранько Ирина Юрьевна).

Отметка в командировочных удостоверениях будет осуществляться при регистрации участника на Съезд.

Условия проживания участника IV Съезде токсикологов России

Информация об условиях размещения и стоимости проживания участников находится в Приложении № 4.
Проживание участника оплачивается отдельно, наличными по прибытии на Съезд либо заблаговременно при оплате по безналичному расчету.

Информация для рекламодателей и желающих участвовать в выставке находится в Приложении № 5.

Данные Организатора Съезда и контактное лицо
Фактический и почтовый адрес: 117105, г. Москва, Варшавское шоссе, 19А, каб. 713.
Телефон: (499) 940-97-87; факс (499) 940-97-75.
Сайт: www. rpohv.ru
E-mail: secretary@rpohv.ru.
Технический секретариат съезда
Контактное лицо: секретарь Оргкомитета съезда – начальник информационно-аналитического отдела ФБУЗ «Российский регистр потенциально опасных химических и биологических веществ» Роспотребнадзора Дорофеева Екатерина Валентиновна

Приложение № 2

Требования к оформлению тезисов (материалов для публикации)

Общие:
– объем до 3 страниц в электронном варианте;
– текстовый редактор – Microsoft Word;
– шрифт – Times New Roman, кегль 12;
– межстрочный интервал – одинарный;
– поля – сверху и снизу по 2 см, слева и справа по 3 см;
– рисунки черно-белые в тексте и отдельными файлами в формате «jpg»;

Заголовок:
– 1-я строка: название доклада (может быть в несколько строк) – шрифт Arial, полужирный, кегль 12, выравнивание по центру, все буквы прописные;
– 2-я строка: пустая;
– 3-я строка: И. О. Фамилия авторов – шрифт Arial, курсив, кегль 12, выравнивание по центру; фамилию докладчика следует выделить подчеркиванием;
– 4-я строка: пустая;
– 5-я строка: полное название организации – шрифт Arial, курсив, кегль 12, выравнивание по правому краю;
– 6-я строка: название города, страны – шрифт Arial, курсив, кегль 12, выравнивание по правому краю;
– 7-я, 8-я строка: пустая.

Аннотация, не более 80 слов, ключевые слова, библиографический список литературы, УДК.

Текст доклада.
Материалы для публикации должны быть представлены в Оргкомитет Съезда строго **не позднее 1 сентября 2013 года** в электронном виде по адресу secretary@rpohv.ru

При получении Оргкомитетом Съезда тезисов на Ваш адрес электронной почты будет выслано извещение. Если Вы не получите извещения в течение 5 рабочих дней, необходимо повторить отправку. При отсутствии подтверждения просим связаться с Оргкомитетом Съезда.

Приложение № 3

О конкурсе «Лучшая работа молодого ученого»

К участию в конкурсе приглашаются **молодые ученые в возрасте до 35 лет, а также кандидаты и доктора наук в возрасте до 39 лет включительно**, выполняющие научные исследования в следующих областях:
– профилактическая токсикология;
– клиническая токсикология;
– лекарственная токсикология;
– экологическая токсикология.

Конкурс подразумевает **личное участие** автора с докладом на Съезде (тезисы доклада оформляются в соответствии с требованиями Оргкомитета Съезда к тезисам).

Для участия в конкурсе **до 1 сентября 2013 г.** необходимо представить:

А) **Заявку от организации на участие специалиста (молодого ученого) в конкурсе** со сведениями об авторе (ФИО, название организации, должность, образование (учебное заведение, год окончания), ученую степень, дату рождения, адрес, телефон, факс, e-mail).

Б) Конкурсную работу.

Доклады, выполненные в соавторстве, в конкурсе не участвуют.

Приложение № 5

Информация для рекламодателей

Устная презентация
15 минут – 15 тысяч рублей.
Рекламное сообщение
в сборнике тезисов
(400 – 500 экз. – цветная реклама (4 цвета)
на 3-й или 4-й странице обложки – 15 тысяч рублей.
Вкладка 4 – цветная:
4 с. – 2 листа – формат А4;
вся вкладка – 30 тысяч рублей; 1 с. А4 – 15 тысяч рублей,
½ с. А4 – 8 тысяч рублей,
¼ с. А4 – 4 тысячи рублей.
Черно-белая реклама:
1 с. А4 – 12 тысяч рублей,
½ с. А4 – 6 тысяч рублей,
¼ с. А4 – 3 тысячи рублей.
Стендовый доклад –
5 тысяч рублей.
Стенд 1 день – 15 тысяч рублей.

Приложение № 4

Информация об условиях размещения участников и стоимости проживания

Гостиница «Измайлово» корпус «Гамма – Дельта» (адрес Москва, Щелковское шоссе, 71. Проезд: станция метро «Партизанская» Арбатско-Покровской линии /синяя ветка/, далее 3-5 минут ходьбы).

Если Вам удобно будет **оплачивать за наличный расчет,** то цены будут действовать **на момент поселения**. На данный момент стоимость номеров составляет:

! Обращаем внимание, что гостиницей в сентябре 2013 г. планируется повышение цен на 10%.

Категория номеров	Цены (в рублях)	
	Будние дни (пн-чт)	Выходные дни (пт-вс)
Отель ГАММА* **		
Стандарт Плюс		
Двухместный номер	4300	3655
Отель ДЕЛЬТА** **		
Бизнес Премиум		
Одноместный номер	4950	4200
Двухместный номер	5100	4350

При оплате по безналичному расчету стоимость номеров будет составлять:

Стоимость указана в рублях за номер в сутки независимо от количества проживающих в нем человек (1 или 2). В день поселения эта стоимость соответствует проживанию в течение 22 часов.

Категория номеров	Цены (в рублях)	
	Будние дни (пн-чт)	Выходные дни (пт-вс)
Отель ГАММА* **		
Стандарт Плюс		
Двухместный номер	3350	2350
Отель ДЕЛЬТА** **		
Бизнес Премиум		
Одноместный номер	3715	2720
Двухместный номер	3825	2805

При оплате по безналичному расчету участник (организация участника) заключает договор с гостиницей (контактные телефоны отдела бронирования (495) 737-7070, 737-7192; факс (495) 737-7052), при обращении необходимо сообщить гостинице, что вы являетесь УЧАСТНИКОМ (ДЕЛЕГАТОМ) IV СЪЕЗДА ТОКСИКОЛОГОВ РОССИИ (ТОЛЬКО В ЭТОМ СЛУЧАЕ ГОСТИНИЦЕЙ БУДУТ ПРЕДОСТАВЛЕНЫ СКИДКИ!)

РЕЕСТР СВИДЕТЕЛЬСТВ О ГОСУДАРСТВЕННОЙ РЕГИСТРАЦИИ

(единая форма Таможенного союза, российская часть)

№ п/п	Наименование продукта	Производитель	Получатель	Номер свидетельства о госрегистрации, дата регистрации	Наименование вещества по IUPAC	№ CAS/EC	Синонимы, торговые и фирменные названия	Номер РПОХБВ
1	RAW MATERIAL R-3099 (RM-3099)	«Nalco Europe Sarl», A-One Business Center, Z.A. La Piece 1 Route de l'Etraz, 1180 Rolle, Switzerland. «Nalco Europe B.V.», Ir G. Tjalmaweg 1, 2342 BV Oegstgeest, Postbus 627, 2300 AP Leiden, The Netherlands. «Nalco Osterreich Ges.m.b.H.», Scheydgasse 34-36, A-1210 Vienna, Austria. «NALCO FRANCE SAS», P.O. Box 50039, 59447 Wasquehal Cedex. «Nalco Finland Oy.», Innopoli, Tekniikantie 12, 02 150 Espoo. «Nalco Deutschland GmbH», Ludwig-Landmann-Strasse 405, 60486 Frankfurt am Main. «Nalco Italiana srl.», Viale dell'Esperanto 71, 00144 Rome. «Nalco Espanola S.A.», P.O. Box 30175, 08080 Barcelona. «Nalco Limited», P.O. Box 11, Northwich, Cheshire CW8 4DX. (Великобритания)	ТОО «РауанНалко», 060007, г. Атырау, ул. Кулманова, 113 (Казахстан)	RU.77.99.32.008. E.005332.03.12 от 19.03.2012	Уксусная кислота	64-19-7/ 200-580-7	Этановая кислота; метанкарбоновая кислота	серия ВТ № 000069
2	NALCO® RM2170	«Nalco Europe Sarl», A-One Business Center, Z.A. La Piece 1 Route de l'Etraz, 1180 Rolle, Switzerland. «Nalco Europe B.V.», Ir G. Tjalmaweg 1, 2342 BV Oegstgeest, Postbus 627, 2300 AP Leiden, The Netherlands. «Nalco Osterreich Ges.m.b.H.», Scheydgasse 34-36, A-1210 Vienna, Austria. «NALCO FRANCE SAS», P.O. Box 50039, 59447 Wasquehal Cedex. «Nalco Finland Oy.», Innopoli, Tekniikantie 12, 02 150 Espoo. «Nalco Deutschland GmbH», Ludwig-Landmann-Strasse 405, 60486 Frankfurt am Main. «Nalco Italiana srl.», Viale dell'Esperanto 71, 00144 Rome. «Nalco Espanola S.A.», P.O. Box 30175, 08080 Barcelona. «Nalco Limited», P.O. Box 11, Northwich, Cheshire CW8 4DX. (Великобритания)	ТОО «РауанНалко», 060007, г. Атырау, ул. Кулманова, 113 (Казахстан)	RU.77.99.32.008. E.005331.03.12 от 19.03.2012	2-Меркаптоуксусная кислота	68-11-1/ 200-677-4	Этандиовая кислота; альфа-меркаптоуксусная кислота, ацетилмеркаптан, 2-тиоуксусная кислота; тиогликолевая кислота	серия ВТ № 003400
3	NALCO® FX2521	«Nalco Europe Sarl», A-One Business Center, Z.A. La Piece 1 Route de l'Etraz, 1180 Rolle, Switzerland. «Nalco Europe B.V.», Ir G. Tjalmaweg 1, 2342 BV Oegstgeest, Postbus 627, 2300 AP Leiden, The Netherlands. «Nalco Osterreich Ges.m.b.H.», Scheydgasse 34-36, A-1210 Vienna, Austria. «NALCO FRANCE SAS», P.O. Box 50039, 59447 Wasquehal Cedex. «Nalco Finland Oy.», Innopoli, Tekniikantie 12, 02 150 Espoo. «Nalco Deutschland GmbH», Ludwig-Landmann-Strasse 405, 60486 Frankfurt am Main. «Nalco Italiana srl.», Viale dell'Esperanto 71, 00144 Rome. «Nalco Espanola S.A.», P.O. Box 30175, 08080 Barcelona. «Nalco Limited», P.O. Box 11, Northwich, Cheshire CW8 4DX. (Великобритания)	ТОО «РауанНалко», 060007, г. Атырау, ул. Кулманова, 113 (Казахстан)	RU.77.99.32.008. E.005326.03.12 от 19.03.2012	2,2-Дибром-2-цианацетамид	10222-01-2/ 233-539-7	2-Циано-2,2-дибромацетамид; альфа, альфа-дибром-альфа-цианацетамид; 2,2-дибром-2-карбамоилацетонитрил; 2,2-дибром-3-нитрилопропионамид	серия ВТ № 002887
4	Метил Этил Кетоксим (МЭКО)	«GUJARAT STATE FERTILIZERS & CHEMICALS LIMITED», P.O. FERTILIZERNAGAR 391 750, DIST. VADODRA, GUJARAT (Индия)	«GUJARAT STATE FERTILIZERS & CHEMICALS LIMITED», P.O. FERTILIZER-NAGAR 391 750, DIST. VADODRA, GUJARAT (Индия)	RU.77.99.88.008. E.005183.03.12 от 15.03.2012	Бутан-2-оноксим	96-29-7/ 202-496-6	Этилметилкетоксим; Methyl Ethyl Ketoxime (MEKO)	серия ВТ № 002443
5	Уайт-спирит DULUX SOLVE W	«Akzo Nobel Baltics AS» TOBIASE 8 TALLINN 10147 Estonia (Эстония)	Akzo Nobel Baltics AS» TOBIASE 8 TALLINN 10147 Estonia (Эстония)	RU.77.99.88.008. E.005182.03.12 от 15.03.2012	Изоалканы C11-15	90622-58-5/ 292-460-6	Изопарафиновые углеводороды C11-15	серия ВТ № 003660
6	Карбонил молибдена	ОАО «Редкинский опытный завод», 171296, Тверская область, Конаковский район, с. Городня, ул. Ленинградская, д. 195 (Российская Федерация)	ОАО «Редкинский опытный завод», 171296, Тверская область, Конаковский район, с. Городня, ул . Ленинградская, д. 195 (Российская Федерация)	RU.77.99.88.008. E.005770.03.12 от 27.03.2012	Молибден-карбонил (ОС-6-11)	13939-06-5/ 237-713-3	Гексакарбонил молибдена	серия ВТ № 003638