ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ ВЕСТНИК

Toxicological Review

Научно-практический журнал

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

№ 4 (121), **2013**

СОДЕРЖАНИЕ

УДК 614.8:615.099.036.11/.88:546/547 (571.13)

Смертность населения Омской области в результате острых отравлений химической этиологии за 2002–2011 гг.

А.В. Сабаев[1],
О.П. Голева[2]

[1]Бюджетное учреждение здравоохранения Омской области «Городская клиническая больница скорой медицинской помощи №1, 644112, г. Омск
[2]Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Омская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 644043, г. Омск

Целью настоящего исследования стало изучение динамики показателей смертности населения Омской области в результате острых отравлений химической природы за период с 2002 по 2011 гг. Динамика показателей смертности населения при острых экзогенных отравлениях является важнейшей медико-демографической характеристикой преждевременных социальных потерь. Изучение показателей смертности населения, структуры смертности позволит определить закономерности изменения медико-демографических показателей региона, сформулировать основные причины развития неблагополучной ситуации, разработать концепцию направлений по организации химической безопасности населения Омской области.

Ключевые слова: *острые отравления; смертность населения; химическая безопасность.*

Введение. Изучение уровня и структуры смертности дает наиболее полное представление о состоянии здоровья населения, отражает эффективность мероприятий, проводимых органами и учреждениями здравоохранения и государства в целом по оздоровлению населения.

В структуре причин смерти по классу несчастных случаев, травм и отравлений увеличивается доля острых отравлений химической природы. Причем, если ранее неблагоприятное воздействие химических веществ распространялось преимущественно на рабочих отдельных вредных промышленных производств или население, живущее в непосредственной близости от соответствующих предприятий, то в настоящее время в клинике острых отравлений сложились устойчивые приоритеты, относящиеся к лекарственным и наркотическим средствам, природным токсинам, которые в основном определяют токсикологическую ситуацию [1].

Острые экзогенные отравления включены в класс XIX МКБ-10, объединяющий большое число нозологических форм, из которых в России лишь небольшая часть подлежит государственной регистрации. В частности, статистической формой С-51 предусмотрены сведения об умерших по причине случайного отравления алкоголем (рубрика 163) и «прочих случайных отравлений (рубрика 164). Вместе с тем по данным литературы и официальной статистики трудно получить истинное представление о распространенности острых отравлений и смертности в результате данного вида травм из-за отсутствия четкого учета [2, 4, 5].

Изучение причин и частоты встречаемости неинфекционных заболеваний на основе эпидемиологических методов заняло одно из ведущих мест в современной медицине, позволяя получать ценные сведения о распространенности данной патологии среди населения и факторах, обусловливающих их развитие. Тем не менее, в настоящее время эпидемиология острых отравлений изучена недостаточно, так как практически во всех странах мира не налажена должным образом система учета больных с этой патологией [3, 6].

Целью настоящего исследования стало изучение динамики показателей смертности населения Омской области в результате острых отравлений химической этиологии за период с 2002 по 2011 г.

Материалы и методы исследования. При изучении смертности населения в результате острых химических отравлений использованы материалы Территориального органа государственной статистики по Омской области, бюджетного учреждения здравоохранения Омской области «Бюро судебно-медицинской экспертизы», бюджетного учреждения здравоохранения Омской области «Городская клиническая больница скорой медицинской помощи №1». Проведен анализ показателей смертности городского и сельского населения Омской области в результате острых химических отравлений за период с 2002 по 2011 г.

При статистической обработке материала использованы традиционные методы вычисления экстенсивных и интенсивных показателей, средней ошибки показателя, оценки достоверности показателя.

Результаты и обсуждение. За период с 2002 по 2011 гг. смертность населения Омской области в результате острых отравлений химической этиологии снизилась на 20,7% по отношению к исходному уровню ($t = 5,4$, $p = 0,0000$).

Наиболее высокие темпы прироста показателей смертности отмечены в 2005 г. – 26,5%. Максимального своего значения за весь период наблюдения смертность в результате острых химических отравлений достигла в 2006 г. – 80,9 ± 1,9 случая на 100 тыс. населения. С 2007 г. идет постепенное снижение показателя смертности населения в результате острых отравлений, достигнув минимального своего значения за весь период наблюдения в 2011 г. – 45,6 ± 1,5 случая на 100 тыс. населения. Сглаживание кривой показателей смертности населения на основе аппроксимирующей функции с помощью полинома 2-й степени свидетельствует о дальнейшей тенденции снижения данного показателя ($R^2 = 0,6836$) (рис. 1).

При однонаправленности динамики показателей смертности в результате острых отравлений химической природы в городе и селе необходимо отметить, что за последние три года темпы снижения показателя смертности у городского населения были выше, чем у сельского (рис. 2).

Наиболее высокими темпы прироста показателя смертности городского населения в результате острых отравлений отмечался в 2005 гг. – 29,6%. Максимального своего значения смертность городского населения достигла в 2006 г. и составила 84,1 ± 2,4 случая на 100 тыс. населения. Однако с 2007 г. идет постепенное снижение показателя смертности. Таким образом, за исследуемый период смертность городского населения в результате острых химических отравлений снизилась на 28,2% ($t = 6,4$, $p = 0,0000$).

При изучении динамики показателей смертности сельского населения установлено, что с 2002 по 2006 г. отмечался неуклонный рост показателя смертности, лишь в 2004 г. наблюдалось снижение на 18,8%. Максимального своего значения показатель смертности сельского населения достиг в 2006 г. – 73,7 ± 3,4 случая на 100 тыс. населения. В последующие годы отмечалось менее интенсивное снижение смертности по сравнению с аналогичным городского населения. В целом за исследуемый период существенной динамики показателя смертности сельского населения в результате острых химических отравлений не наблюдается. Математическая обработка при помощи парного двухвыборочного теста доказывает, что различия показателей смертности городского и сельского населения статистически незначимы ($t = 0,2$, $p = 0,8415$).

В структуре смертности населения Омской области в результате острых отравлений химической этиологии на первом месте стабильно находятся острые отравления этанолом и его суррогатами (табл.). За анализируемый период смертность в результате острых отравлений алкоголем и его суррогатами снизилась на 28,9% ($t = 5,9$, $p = 0,0000$). Рост уровня смертности населения в результате алкогольных отравлений отмечался в 2003 и 2005 гг. на 16,0 и 22,3% соответственно. Максимальный показатель смертности населения в результате этой причины зарегистрирован в 2005 г. – 37,2 ± 1,3 случая на 100 тыс. населения. С 2006 г. отмечается ежегодное снижение показателя смертности при данной патологии и уже в 2011 г. значение показателя смертности достигло минимального своего значения за весь период наблюдения – 20,4 ± 1,0 случая на 100 тыс. населения.

Сабаев Александр Владимирович (Sabaev Aleksandr Vladimirovich), кандидат медицинских наук, заведующий отделением острых отравлений (у психиатрических больных) Бюджетного учреждения здравоохранения Омской области «Городская клиническая больница скорой медицинской помощи №1», alesabaev@yandex.ru
Голева Ольга Петровна (Goleva Olga Petrovna), доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой общественного здоровья и здравоохранения с курсом истории медицины и биомедицинской этики ГБОУ «Омская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации,goleva50@mail.ru

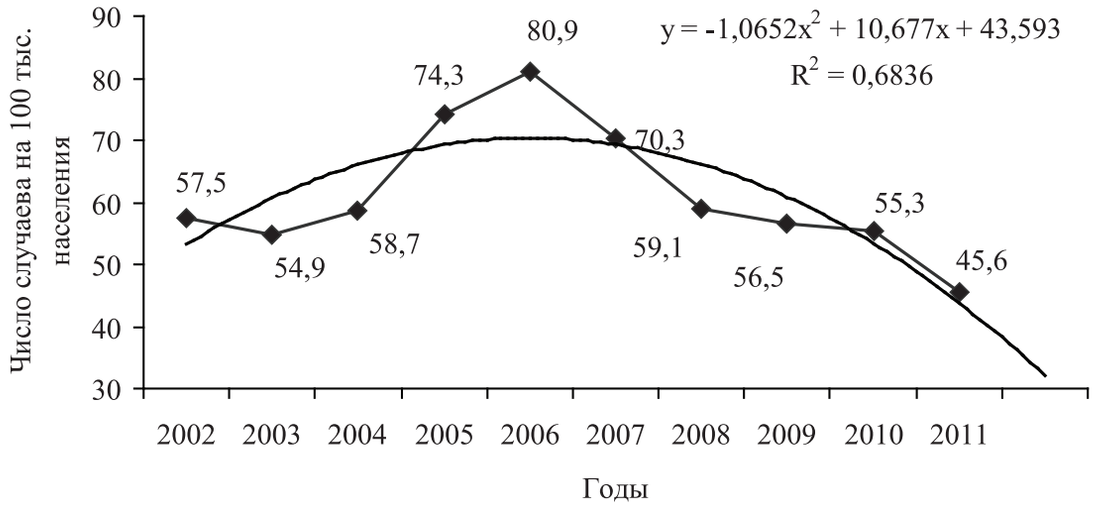


Рис.1. Динамика показателей смертности населения Омской области в результате острых отравлений химической природы за 2002–2011 гг. (на 100 тыс. населения)

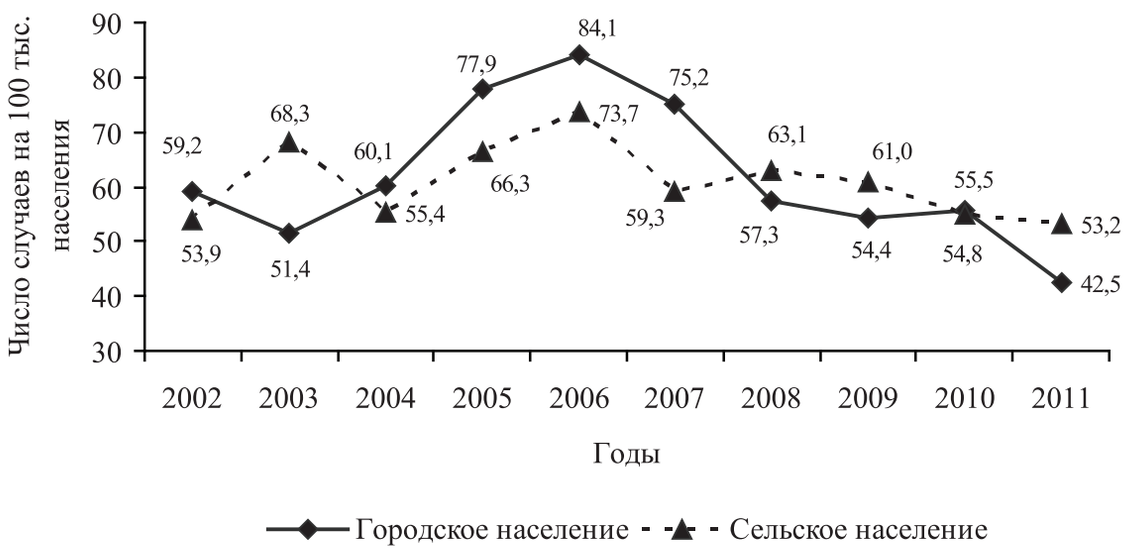


Рис. 2. Динамика показателей смертности городского и сельского населения Омской области в результате острых отравлений химической этиологии за 2002-2011 гг. (на 100 тыс. населения)

Смертность населения региона в результате острых отравлений медикаментами выросла в 2,1 раза, достигнув максимального своего значения в 2011 г. – 2,6 ± 0,3 случая на 100 тыс. населения ($t = 4,6$, $p = 0,0000$).

За период наблюдения показатель смертности населения Омской области в результате острых отравлений наркотическими веществами носил нестабильный характер. Так, в 2002 и 2003 гг. отмечались невысокие показатели смертности, однако в 2004 г. произошел рост смертности в 3,3 раза, в следующем 2005 г. вновь удвоение показателя. В 2006 г. смертность в результате наркотических отравлений выросла на 38,9% и достигла своего максимального значения за весь период наблюдения – 22,1 ± 1,0 случая на 100 тыс. населения. За период с 2007 по 2009 г. отмечалось ежегодное постепенное снижение показателя смертности, но в 2010 г. вновь произошел рост на 17,3%. Таким образом, за период с 2002 по 2011 г. смертность населения Омской области в результате наркотических отравлений выросла в 1,8 раза ($t = 5,0$, $p = 0,0000$).

Показатель смертности населения Омской области в результате острых отравлений прижигающими ядами (кислоты, щелочи) снизился за наблюдаемый период в 1,7 раза ($t = 4,0$, $p = 0,0001$).

Показатель смертности населения в результате отравлений вредными парами и газами занимает второе место по частоте летальных исходов в результате химических отравлений в регионе, хотя за анализируемый период смертность населения Омской области в результате отравлений парами и газами снизилась на 24,0% ($t = 3,6$, $p = 0,0003$). Основу этих отравлений по-прежнему составляют острые отравления окисью углерода. Это обусловлено тем, что в регионе широко распространено печное отопление жилых домов, нарушение правил эксплуатации и безопасности которого приводит нередко к трагическим последствиям. Кроме этого, немаловажную роль играет число бытовых пожаров и несчастных случаев в автомобильных боксах и гаражах, где риск получения острого химического отравления в результате воздействия на организм человека окиси углерода очень высок.

За период с 2002 по 2011 г. отмечается существенное, в 1,9 раза, снижение смертности населения Омской области в результате отравлений промышленными ядами ($t = 3,6$, $p = 0,0003$).

Показатели смертности в остальных группах острых отравлений химической природы существенных изменений в динамике за анализируемый период не претерпевали.

Таблица

Показатели смертности в основных группах острых отравлений населения Омской области за 2002–2011 гг. (на 100 тыс. населения) (P ± m)

Токсикант	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
Этанол и его суррогаты	28,7±1,1	33,3±1,2	30,4±1,2	37,2±1,3	36,8±1,3	32,8±1,2	29,9±1,2	29,5±1,2	25,8±1,1	20,4±1,0
Медикаменты	1,2±0,2	0,5±0,1	1,7±0,2	0,7±0,1	0,9±0,2	1,4±0,2	1,6±0,2	0,7±0,1	1,0±0,2	2,6±0,3
Наркотики	2,8±0,3	2,2±0,3	7,4±0,6	15,9±0,8	22,1±1,0	19,8±0,9	10,4±0,7	9,2±0,6	10,8±0,7	5,3±0,5
Прижигающие яды	4,7±0,4	2,4±0,3	3,6±0,4	3,5±0,4	2,5±0,3	2,6±0,3	2,9±0,3	2,2±0,3	2,1±0,3	2,7±0,3
Вредные пары и газы	16,6±0,8	14,9±0,8	13,1±0,8	14,1±0,8	16,1±0,8	13,4±0,8	12,8±0,7	13,0±0,8	13,4±0,8	12,6±0,8
Промышленные яды	2,3±0,3	1,5±0,2	1,4±0,2	0,8±0,2	0,8±0,2	0,2±0,0	0,8±0,2	0,8±0,2	1,3±0,2	1,2±0,2
Пестициды	0,1±0,0	0,1±0,0	–	–	–	0,1±0,0	–	0,1±0,0	–	–
Прочие яды	1,1±0,2	–	1,1±0,2	1,2±0,2	1,3±0,2	0,6±0,1	0,5±0,1	0,6±0,1	0,5±0,1	0,5±0,1

Заключение. За период с 2002 по 2011 г. в Омской области смертность в результате острых отравлений химической этиологии снизилась на 20,7%. Причем снижение смертности статистически достоверно среди городского населения, среди сельского населения региона существенной динамики показателя смертности нет.

В течение всего периода исследования наиболее высокие показатели смертности отмечены при острых отравлениях алкоголем и его суррогатами, вредными парами и газами. Тем не менее отмечается достоверное снижение смертности по данным причинам.

За исследуемый период существенно выросла смертность в результате отравлений наркотиками, лекарственными веществами. Снижение смертности произошло в группах острых отравлений прижигающими и промышленными ядами.

Уровень смертности при острых экзогенных отравлениях является важнейшей медико-демографической характеристикой преждевременных социальных потерь. Изучение показателей и структуры смертности населения позволит определить закономерности изменения медико-демографических показателей региона, сформулировать основные причины развития неблагополучной ситуации, разработать концепцию направлений по организации химической безопасности населения Омской области.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Курляндский Б. А.* Основные направления международной деятельности по медицинским проблемам химической безопасности и возможности их реализации в Российской Федерации // Токсикол. вестник. – 2001. – № 6. С. 2–5.

2. *Литвинов Н.Н., Остапенко Ю.Н., Казачков В.И.* Информационные технологии для практики клинической токсикологии: итоги и перспективы // Токсикол. вестник. – 1995. № 6. – С. 16–20.

3. *Лужников Е.А.* Клиническая токсикология: учеб. / Е. А. Лужников, Г. Н. Суходолова. – 4-е изд., перераб. и доп. – М. : МИА, 2008. – 576 с.

4. *Остапенко Ю.И., Литвинов Н.Н., Казачков В.И. и др.* Информатизация как важный раздел работы центров лечения острых отравлений // Острые отравления и эндогенные интоксикации. – Екатеринбург; 1998. С. 44–46.

5. *Остапенко Ю.Н., Литвинов Н.Н., Хальфин Р.А. и др. Токсикологический мониторинг – новый метод учета и анализа токсикологической ситуации в стране // О мерах по совершенствованию оказания медицинской помощи больным с острыми отравлениями: Материалы Рос. науч. конф. Екатеринбург, 18–21 сент. 2002 г. Москва; Екатеринбург, 2002. С. 16–22.*

6. *Сенцов В.Г., Богданов С.И., Ножкина Н.В. Отравления наркотиками в Екатеринбурге: мониторинг ситуации, связанной с употреблением наркотиков / В. Г. Сенцов, С. И. Богданов, Н. В. Ножкина. – Екатеринбург: Изд-во Уральского ун-та, 2002. – Вып. 4. – 49 с.*

A.V. Sabaev[1], O.P.Goleva[2]

Mortality rate among population following acute intoxications of chemical etiology in the Omsk region

[1]Omsk region health care establishment «City clinical hospital of an emergency medical service N. 1» 644112, Omsk, Russian Federation
[2]Omsk State Medical Academy, 644043, Omsk, Russian Federation

The purpose of the study was to investigate the dynamics of mortality rate among population following acute intoxications of chemical etiology in the Omsk region over the period 2002 to 2011.The dynamics of the population's mortality rate from acute exogenous intoxications is the most important medico-demographic characteristics of untimely social losses. Investigation of the mortality rate and structure in large population allows to determine regularities of changes in medical and demographic indicators in the region, to lay down main causes of the deteriorating situation, develop a concept of guidelines to ensure chemical safety of population in the Omsk region.

Key words: *acute intoxications, mortality among population, chemical safety*

Переработанный материал поступил в редакцию 13.05.2013 г.

УДК 615.065 - 615.21

Состояние противоинфекционной резистентности у больных с острыми отравлениями нейротропными веществами тяжелой степени

С.Ф. Багненко, В.В. Шилов, Л.П. Пивоварова, М.Е. Малышев, В.А. Лукин, И.В. Осипова, О.Б. Арискина

ГБУ СПб «НИИ скорой помощи им. И.И. Джанелидзе», 192242, г. Санкт-Петербург

Изучено влияние острой тканевой гипоксии на развитие синдрома системного воспалительного ответа (ССВО), выявлены маркеры его развития у больных с острыми отравлениями лекарственными препаратами нейротропного действия. Показано, что на фоне гипоксии у больных с острыми отравлениями формируется ССВО, предшествующий развитию тяжелого сепсиса и ПОН, предикторами развития которых явились повышение содержания в крови ИЛ-8 и ИЛ-10 уже через сутки, а также ИЛ-6 и прокальцитонина (ПКТ) – на 3-и сутки после токсического воздействия.

Ключевые слова: *синдром системного воспалительного ответа, цитокины, нейротропные средства*.

Введение. В структуре острых отравлений преобладают интоксикации веществами нейротропного действия, вызывающие первичное поражение центральной нервной системы и приводящие к формированию критических состояний в результате срыва нервной регуляции жизненно важных функций [7]. Одним из таких расстройств выступает нарушение дыхания с развитием острой дыхательной недостаточности (ОДН) и гипоксии [3].

Наиболее типичными представителями нейротропных лекарственных веществ являются снотворные (производные барбитуровой кислоты) [1,3] и нейролептики (азалептин), вызывающие тяжелые первичные поражения ЦНС с развитием коматозного состояния [2], глубина которого находится в прямой зависимости от дозы поступившего в организм ксенобиотика [5]. Механизм действия нейролептиков и барбитуратов связывают с угнетением синаптической передачи нервных импульсов в ЦНС вследствие пресинаптических эффектов (снижение выделения медиаторов) и постсинаптического торможения, воздействием на дофаминовые, адрено- и серотонинэргические, гистаминовые и ацетилхолиновые (M_4) рецепторы [10, 11, 12].

Тяжелые острые отравления нейротропными веществами обусловливают развитие гипоксической гипоксии вследствие нарушения внешнего дыхания, циркуляторной – в результате расстройств общего и регионарного кровообращения и микроциркуляции, а также тканевой гипоксии, связанной с нарушениями кислотно-основного состояния и прямым угнетающим влиянием высоких доз препаратов на дыхательные ферменты [3].

Цель исследования – изучить влияние острой тканевой гипоксии на развитие синдрома системного воспалительного ответа и выявить маркеры его развития у больных с острыми отравлениями нейротропными веществами тяжелой степени.

Материалы и методы исследования. Исследование проведено у 76 больных с острыми отравлениями нейротропными ядами, поступивших в отделение реанимации центра по лечению острых отравлений ГБУ СПб «НИИ скорой помощи им. И.И. Джанелидзе»; из них 27 мужчин (средний возраст 43,8 ± 5,6) и 49 женщин (средний возраст 42,3 ± 7,2). Группу сравнения составили 30 здоровых волонтеров (средний возраст 35,8 ± 7,9).

Состояние больных при поступлении оценивали как тяжелое и крайне тяжелое. Тяжесть состояния больных была обусловлена токсической энцефалопатией, которая проявлялась нарушением сознания от сопора до комы II–III степени. В 75% случаев больные нуждались в проведении искусственной вентиляции легких в связи с развитием ОДН. У 35% пострадавших при поступлении диагностирована пневмония, подтвержденная рентгенологическим исследованием. Лечение включало проведение инфузионной терапии, эфферентных методов детоксикации – плазмафереза, гемосорбции, а также антибактериальную и симптоматическую терапию.

В зависимости от исхода острого отравления все исследуемые пациенты были разделены на 2 группы: 1) выжившие (n = 42) и 2) умершие (n = 34) (табл. 1).

Уровень сознания определяли по шкале комы Глазго. Развитие ССВО, сепсиса и тяжелого сепсиса определяли по наличию признаков, представленных в рекомендациях Калужской согласительной конференции (2004). Тяжесть полиорганной недостаточности, связанной с сепсисом, оценивали по шкале SOFA (1994), принятой Европейским обществом интенсивной терапии.

Степень гипоксии у пострадавших оценивали по уровню PaO_2 в артериальной крови. В качестве показателей активности воспаления исследовали: содержание ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10 в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа («Bender», Австрия), ПКТ – иммунолюминометрическим методом («Brahms AG», Германия), содержание С-реактивного белка (СРБ) – методом латексной агглютинации («Human», Германия). Исследования выполняли при поступлении пациентов в стационар, через 24 ч, на 3-и и 5-е сутки после отравления. Статистическая обработка результатов исследования осуществлена с помощью программ Excel и Statistica for Windows.

Результаты и обсуждение. Нарушение сознания при отравлениях производными барбитуровой кислотой характеризовалось глубиной токсического поражения головного мозга и развитием комы с атонией скелетной мускулатуры, арефлексией, бледностью кожного покрова. Помимо центральных механизмов развития ОДН при поступлении в 29,8% отмечали гипергидратацию легких, в 61,8% случаев – развитие пневмонии, в 12,1% – обтурационно-аспирационный синдром.

При остром отравлении нейролептиками наибольшее число поступивших составили больные с интоксикацией азалептином (лепонексом). Коматозное состояние при отравлении азалептином сопровождалось развитием ОДН смешанного генеза. У больных этой группы центральные механизмы угнетения дыхания сочетались с обтурационными нарушениями в результате бронхореи и гиперсаливации, у 43 больных (56,5%) уже при поступлении отмечали развитие пневмонии. У 15 больных (19,7%) наблюдали нестабильность гемодинамики, у 18 (23,6%) – развитие гиперкинезов, у 27 больных (35,5%) – отек-набухание головного мозга. Основными причинами смерти при отравлениях нейролептиками в остром периоде явилось развитие острой дыхательной и сердечно-сосудистой недостаточности, в соматогенной фазе острого отравления – необратимое гипоксическое повреждение мозга с нарастающими явлениями почечной, печеночной и сердечно-сосудистой недостаточностью.

Снижение уровня парциального давления кислорода в артериальной крови свидетельствовало о наличии гипоксии, которая наблюдалась в обеих группах пострадавших с острыми отравлениями уже с момента поступления в стационар, причем в группе умерших степень гипоксии была достоверно выше начиная с 1-х суток наблюдения (табл. 2).

Результаты клинических и лабораторных исследований у пациентов с острыми отравлениями показали, что у всех исследуемых имеют место клинические (тахикардия – 102 ± 12,3 уд./мин., тахипноэ – 32 ± 3,8 уд./мин., гипертермия – 39,4±0,8^{0}C) и лабораторные (лейкоцитоз – 18,4 ± 1,7, pCO2 33,2 ± 1,1 мм рт. ст.) признаки ССВО, причем у больных с летальным исходом наблюдалось большее количество признаков ССВО по сравнению с группой выживших. К 5-м суткам в группе выживших пациентов количество признаков ССВО снижалось с 2,0 ± 0,5 до 0,8 ± 0,5 ($p < 0,05$), в то время как в группе умерших пациентов наблюдали достоверное нарастание органной дисфункции и признаков ССВО, остающееся

Багненко Сергей Федорович (Bagnenko Sergey Fedorovich), ГБУ СПб «НИИ скорой помощи им. И.И. Джанелидзе», surgen57@mail.ru
Шилов Виктор Васильевич (Shilov Viktor Vasilievich), доктор медицинских наук, профессор, ГБУ СПб «НИИ скорой помощи им. И.И. Джанелидзе, Vshilov@inbox.ru
Пивоварова Людмила Павловна (Pivovarova Liudmila Pavlovna), ГБУ СПб «НИИ скорой помощи им. И.И. Джанелидзе, immunemergency@yandex.ru
Мылышев Михаил Евгеньевич (Malyshev Mikhail Evgenievich), ГБУ СПб «НИИ скорой помощи им. И.И. Джанелидзе, immunemergency@yandex.ru
Лукин Вадим Анатольевич (Lukin Vadim Anatolievich), зав. отделением острых отравлений, ГБУ СПб «НИИ скорой помощи им. И.И. Джанелидзе, Vadim.Lukin@mail.ru
Арискина Ольга Борисовна (Ariskina Olga Borisovna), ГБУ СПб «НИИ скорой помощи им. И.И. Джанелидзе, immunemergency@yandex.ru
Осипова Ирина Викторовна (Osipova Irina Viktorovna), ГБУ СПб «НИИ скорой помощи им. И.И. Джанелидзе, immunemergency@yandex.ru

Таблица 1

Общая характеристика групп пациентов с острыми отравлениями

Группа пострадавших	Средний возраст	Сознание (баллы)	Наличие ССВО и гнойных осложнений (чел./%)			
			Без ССВО	ССВО	сепсис	тяжелый сепсис
1 группа (выжившие) (n = 42)	46,3±6,2	5,9±0,9	4 /9,5%	34 /81%	4 /9,5%	0/0%
2 группа (умершие) (n = 34)	53,2±6,4	5,8±1,3	0/0%	4/12%	19/56%	11/32%

Таблица 2

Уровень PaO_2 (мм рт. ст.) в артериальной крови у пациентов

Группа пострадавших	Уровень PaO_2 (мм рт. ст.)			
	Поступление	1-е сутки	3-и сутки	5-е сутки
1 группа (выжившие) (n = 42)	73,6±3,8*	74,1±5,1 *	84,1±6,1 *	97,4±6,2
2 группа (умершие) (n = 34)	68,5±6,5*	65,2±3,4# *	80,1±5,3 *	83,5±4,7
Контроль (n = 30)	93,8±3,5			

Примечание. * – P < 0,05 по сравнению с контрольной группой; # – P < 0,05 по сравнению с выжившими.

стабильным до 5 суток пребывания в реанимационном отделении (табл. 3).

Наряду с общепринятыми клиническими критериями воспаления, в международной и отечественной литературе признаны такие лабораторные показатели, как содержание в крови воспалительных цитокинов, СРБ, прокальцитонина [6, 9]. Одним из ведущих патогенетических факторов системного воспаления выступают выраженная цитокинемия и дисбаланс цитокинов разных функциональных групп (ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10) [8].

ИЛ-6 является ранним индуцибельным полифункциональным цитокином [4]. Он активирует гранулоцитопоэз, усиливает цитотоксическую активность НК-клеток, ингибирует апоптоз Т-лимфоцитов, стимулирует синтез белков острой фазы воспаления в печени, усиливает синтез антител. Мы наблюдали возрастание содержания ИЛ-6 в крови пациентов обеих групп при поступлении, через сутки уровень цитокина в группе выживших снижался до значений нормы, тогда как у умерших повышенная концентрация ИЛ-6 наблюдалась вплоть до 5 суток (рис. 1).

Под влиянием ИЛ-6, в среднем через 24 ч после его появления в крови, происходит усиление синтеза белков острой фазы воспаления, в том числе СРБ [4], являющегося классическим показателем активности острого и хронического воспаления [6].

Уровень СРБ достоверно возрастал у больных обеих групп через сутки после поступления в стационар и, в наибольшей степени, у пациентов с летальным исходом (рис. 2).

Хемокином, вызывающим приток нейтрофилов в очаг воспаления, является ИЛ-8. Основными продуцентами ИЛ-8 считаются активированные при встрече с патогенами моноциты и макрофаги и эндотелиальные клетки [4]. Мы наблюдали увеличение содержания ИЛ-8 при поступлении в обеих группах, при этом уровень цитокина оставался стабильно высоким ($p < 0,05$) у больных с летальным исходом больных вплоть до 5 суток (рис. 3), тогда как у выживших пациентов уже к 3-м суткам содержание ИЛ-8 снижалось до нормы. Высокое содержание данного хемокина в гемоциркуляции способствует нарушению направленной миграции клеток из кровеносного русла в ткани по градиенту концентрации биологически активного вещества.

В ранней фазе развития системного воспаления при критических состояниях происходит увеличение уровня в крови не только про-, но и противовоспалительных цитокинов, в частности ИЛ-10 [8]. Основными продуцентами в первые часы после повреждения тканей (травма, гипоксия) ИЛ-10 являются активированные моноциты крови и тучные клетки слизистых оболочек [4]. Мы обнаружили, что содержание ИЛ-10 в крови пациентов с летальным исходом при поступлении достоверно выше, чем в крови выживших (рис. 4).

Поскольку системное воспаление ассоциировано с развитием тяжелого сепсиса, для оценки уровня воспаления и верификации диагноза сепсиса мы применили содержание прокальцитонина в крови [9]. При острых отравлениях содержание ПКТ резко возрастало начиная с 3-х суток у больных с летальным исходом, а к 5-м суткам увеличивалось до уровня, превышающего диагностическое значение при сепсисе (2 нг/мл), что в сочетании с наличием ПОН и очага бактериальной инфекции свидетельствовало о развитии у них тяжелого сепсиса (рис. 5).

Заключение. Острая тяжелая гипоксия у пациентов с летальным исходом ($pO_2 = 68,5 \pm 6,5$ мм рт. ст.) обусловливала развитие системного воспаления и ПОН уже при поступлении в стационар. К 3–5-м суткам после поступления у больных этой группы наблюдали развитие тяжелого сепсиса, лабораторными предикторами которого в 1-е сутки явились высокие уровни в крови ИЛ-8 (в 5 раз и более) и ИЛ-10 (в 15 раз и более), а диагностическими – увеличение содержания в крови – ИЛ-6 и прокальцитонина на 3-и сутки после токсического воздействия.

Таблица 3

Число признаков ССВО и степень органной дисфункции у пациентов с отравлениями

Группа пострадавших	Число признаков ССВО (по Bone)			Степень органной дисфункции по SOFA		
	1-е сутки	3-и сутки	5-е сутки	1-е сутки	3-и сутки	5-е сутки
1 группа (выжившие) (n = 42)	2,0±0,5	1,6±0,2	0,8±0,5	4,4±1,1	3,6±0,8	2,7±0,6
2 группа (умершие) (n = 34)	3,1±0,4 *	3,2±0,4 *	3,0±0,4*	6,6±1,8 *	6,3±1,1 *	8,7±1,1

Примечание.* – P < 0,05 по сравнению с выжившими.

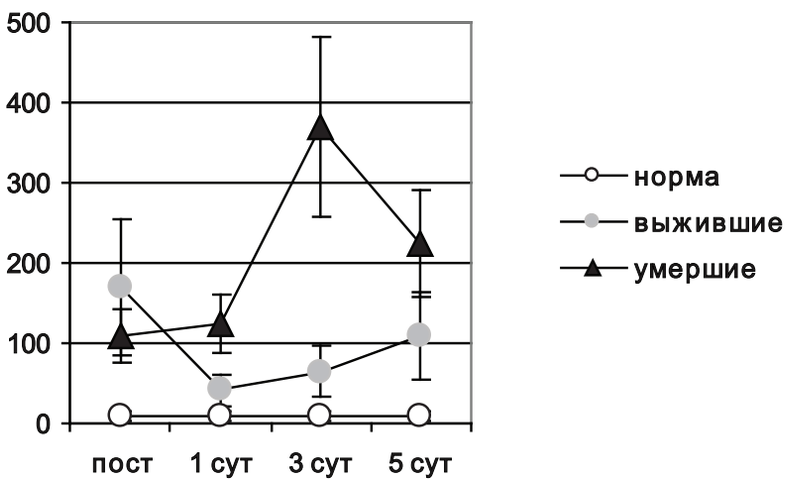


Рис. 1. Содержание ИЛ-6 (пг/мл) у пациентов с отравлениями:
*– P < 0,05 по сравнению с контрольной группой,
– P < 0,05 по сравнению с выжившими.

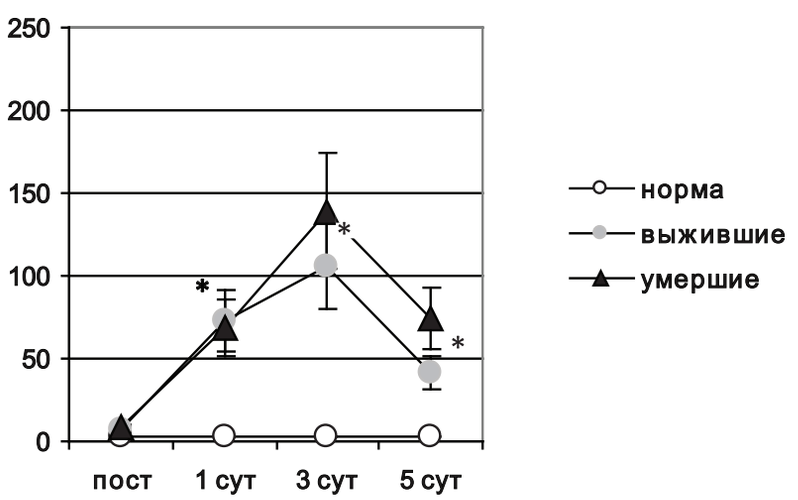


Рис. 2. Содержание СРБ (мг/л) у пациентов с острыми отравлениями:
* – P < 0,05 по сравнению с контрольной группой.

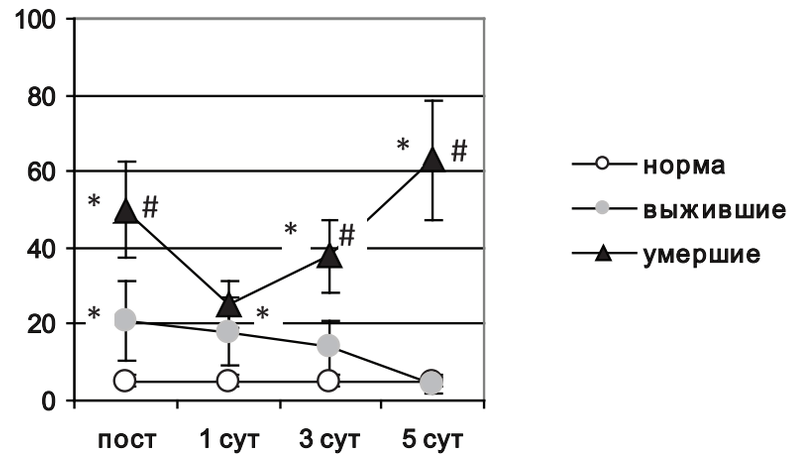


Рис. 3. Содержание ИЛ-8 (пг/мл) у пациентов с острыми отравлениями: * – P < 0,05 по сравнению с контрольной группой, # – P < 0,05 по сравнению с выжившими.

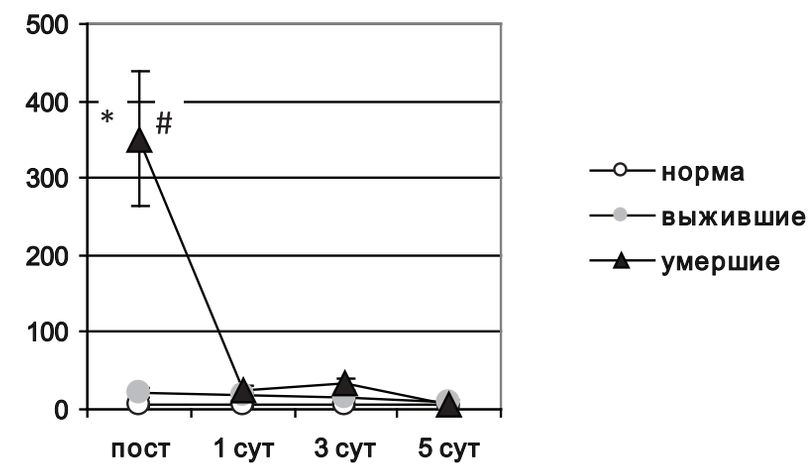


Рис. 4. Содержание ИЛ-10 (пг/мл) у пациентов с острыми отравлениями: * – P < 0,05 по сравнению с контрольной группой, # – P < 0,05 по сравнению с выжившими.

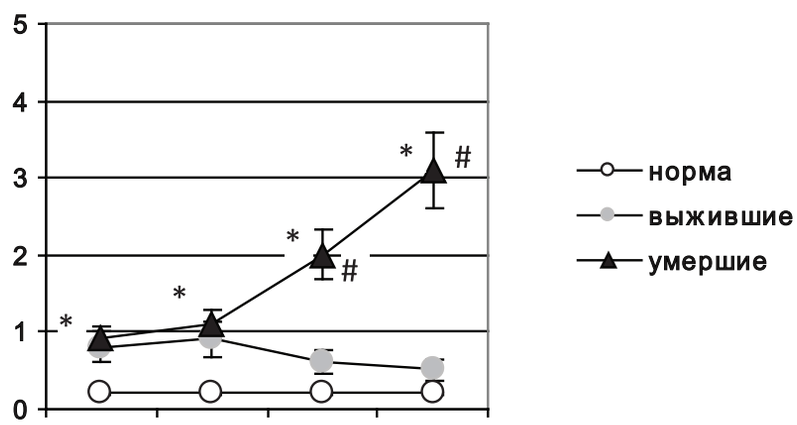


Рис. 5. Содержание ПКТ (нг/мл) у пациентов с острыми отравлениями: * – P < 0,05 по сравнению с контрольной группой, # – P < 0,05 по сравнению с выжившими.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Алехнович А. В.* Структура острых отравлений психофармакологическими веществами // Медицинский вестник МВД. – 2006. – № 4. – С. 37–40.
2. *Бонитенко Ю.Ю.* Отравления азалептином. Клиника, диагностика и лечение / *Ю.Ю. Бонитенко, Е.Ю. Бонитенко, Б.В. Батоцыренов* // Medline.ru. – 2006. – Т. 7. – С. 29–37. – Электрон. журн. – Режим доступа к журн.: http: www.medline.ru.
3. *Калмансон М.Л.* Гипоксия и ее коррекция у больных с острыми отравлениями ядами нейротропного действия: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – СПб., 2001. – 40 с.
4. *Кетлинский С.А., Симбирцев А.С.* Цитокины / СПб: ООО «Издательство Фолиант», 2008. – 552 с.
5. *Куценко С.А.* Основы токсикологии. / С.А. Куценко. – СПб: Фолиант, 2004. – 670 с.
6. *Левит Д.А., Лейдерман И.Н., Гусев Е.Ю и др.* Особенности развития острофазного ответа и цитокинемии при системной воспалительной реакции инфекционного и неинфекционного генеза // Инфекции в хирургию. – 2007. – Т. 5, № 2. – С. 33–37.
7. *Лужников Е.А.* Эндотоксикоз как содержание постреанимационной болезни при острых отравлениях / *Е.А. Лужников, Ю.С. Гольдфарб, К.К. Ильяшенко* // Общая реаниматология. – 2007. – Т. 3, № 5/6. – С. 48–54.
8. Системное воспаление с позиции теории типового патологического процесса/ *Е.Ю. Гусев, В.А. Черешнев, Л.Н. Юрченко* // Цитокины и воспаление. – 2007. – Т. 6, №4. – С. 9–21.
9. *Becker K.L., Snider R., Nylen E.S.* Procalcitonin in sepsis and systemic inflammation: a harmful biomarker and a therpeutic target // British J. Pharm. – 2010. – Vol. 159. – P. 253–264.
10. *Coward D.M.* General pharmacology of clozapine / D.M. Coward // Brit. J. Psychiatry Suppl. – 1992. – Vol. 17. – № 5. – P. 11–17.
11. *Keshavan M.* Muscarinic effects of clozapine and negative symptoms / *M. Keshavan* // Arch. Gen. Psychiatry. – 1993. – Vol. 50. – № 10. – P. 835.
12. *Zorn S.H.* Clozapine is a potent and selective muscarinic M4 receptor agonist / *S.H. Zorn [et al.]* // Eur. J. Pharmacol. – 1994. – Vol. 15. – № 11. – P. 269–273.

S.F. Bagnenko, V.V. Shilov, L.P. Pivovarova, M.E. Malyshev, V.A. Lukin, I.V. Osipova, O.B. Ariskina

The state of antimicrobial resistance in patients with severe poisoning by neurotropic substances

Saint–Petersburg I.I.Dzanelidze Research Institute of Emergency Medicine,192242, Saint–Petersburg, Russian Federation

The influence of acute tissue hypoxia on the development of a systemic inflammatory response syndrome was studied and markers of its development in patients with acute poisoning by neurotropic drugs were identified. It is shown that in the context of hypoxia in patients with acute poisoning, the systemic inflammatory response syndrome is formed, leading to the development of severe sepsis and MOF, predictors of which are the increase in IL-8 and IL-10 levels in blood as soon as 1 day after grade as well as increased levels of IL- 6 and PCT 3 days after the toxic exposure.

Key words: *systemic inflammatory response syndrome, cytokines, neurotropic preparations.*

Переработанный материал поступил в редакцию 27.06.2013 г.

УДК57.052 : 57.044 : 615.099

Взаимодействие химических веществ с белками плазмы крови: методологические проблемы фармако- и токсикокинетики

Н.В. Гончаров [1,2],
Д.С. Прокофьева [2],
П.Н. Сорокоумов [2]

[1] ФГБУН «Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова» Российской академии наук (ИЭФБ РАН), 194223, г. Санкт-Петербург.
[2] ФГУП «Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России, 188663, г. Санкт-Петербург.

Представлен обзор, отражающий современные представления о связывающей способности макромолекул организма по отношению к ксенобиотикам. Подробно описаны существующие и активно развивающиеся методы оценки взаимодействия макромолекул с ксенобиотиками. Даны общие рекомендации по проведению анализа.

Ключевые слова: *фракционирование, плазма, связывание.*

Введение. **Общие представления о специфическом и неспецифическом взаимодействии химических веществ с макромолекулами организма.** При поступлении в кровеносное русло или лимфатические протоки химическое вещество, будь-то лекарственное средство (ЛС) или токсикант, в той или иной степени связывается с белками плазмы крови, что оказывает существенное влияние на его фармако(токсико)кинетику и фармакологические (токсические) эффекты. Когда говорят о связывании вещества с белками плазмы крови, имеют в виду суммарное связывание со всеми белками и форменными элементами крови. Скорость и прочность связывания зависят от конформации и степени комплементарности белковых центров и молекул вещества, а также от характера возникающих при взаимодействии химических связей. Химическое вещество при взаимодействии с биологическими макромолекулами, как правило, одновременно образует несколько видов связей; однако считают, что специфичность комплексообразования обусловлена короткодействующими ван-дер-ваальсовыми силами [1]. Взаимодействие между ЛС (или токсикантом) и белком – обратимый процесс, подчиняющийся закону действия масс. Для большинства исследованных ЛС значения констант диссоциации лежат в широком диапазоне концентраций – от микромолярных до миллимолярных, хотя для некоторых ЛС была показана и более высокая аффинность (нМ) [2]. Образующиеся комплексы в большинстве своем являются непрочными, что позволяет лигандам легко диссоциировать и вступать во взаимодействие с высокоспецифическими рецепторами-мишенями. Несмотря на то что константа связывания ЛС с мишенью (рецептором) может на несколько порядков превышать константу связывания с белками плазмы, концентрация ЛС возле мишени во многом определяется концентрацией его несвязанной фракции в плазме и способностью проходить через гемато-тканевые барьеры. Следовательно, данные по определению свободной и связанной фракции ЛС in vitro не совсем адекватно отражают процессы, происходящие in vivo, поскольку реальные эффекты оказывает не просто свободная фракция, а та ее часть, которая окружает биологическую мишень [3].

При фармакокинетических расчётах необходимо учитывать тот факт, что только свободная фракция ЛС вызывает терапевтический эффект, подвергается метаболизму и клиренсу. При этом все же нельзя априори утверждать, что связанное с белком ЛС не вносит вклад в токсичность препарата. Таким образом, связывание ЛС с белком в некоторых случаях является определяющим фактором в расчёте терапевтической дозы. Например, если препарат с высокой степенью связывания ЛС с белком обладает высокой токсичностью, то приём больших доз этого препарата невозможен, а при малых дозах не достигается его терапевтическая концентрация в крови и доставка к рецепторам-мишеням. В таких случаях совместно с этим ЛС принимают вещества, конкурирующие с ним в связывании с белком и вытесняющие основное ЛС из лиганд-белковых комплексов. Необходимо также отметить непосредственное влияние степени связывания ЛС с белком на фармакокинетические параметры ЛС. Так, для ЛС с высокой аффинностью к белкам период его полувыведения из организма будет более длительным, нежели для ЛС со схожим путём метаболизма и выведения, но с низкой аффинностью к белкам. Таким образом, если необходимо долгое время поддерживать терапевтическую концентрацию ЛС в организме, то предпочтение будет отдано ЛС с более высокой степенью связывания, но только в том случае, если это связывание обратимо и постепенное высвобождение ЛС из белковых комплексов обеспечивает оптимальную терапевтическую концентрацию ЛС в системном кровотоке. Для использования этих эффектов на практике необходимо знать не только степень, но и кинетику связывания ЛС с белком плазмы.

Кроме того, необходимо помнить о том, что при пероральном применении уровень свободной фракции ЛС в плазме крови в первую очередь определяется не его сродством к плазменным белкам, а печеночным клиренсом. При всей важности исследований связывания ЛС с белками плазмы и тканей для исследования их токсикокинетики, оптимизацию или повышение уровня свободной фракции ЛС необходимо проводить с учетом клиренса и транспорта ЛС через гемато-тканевые барьеры, стремясь снизить эти процессы [4]. Необходимость такого всестороннего анализа в решении фармако(токсико)кинетических задач при разработке новых ЛС, который позволял бы предсказывать и объяснять биологический ответ как функцию общей и свободной концентрации ЛС в крови и тканях, была сформулирована еще 20 лет назад [5]. К сожалению, до сих пор в подавляющем большинстве работ такой подход игнорируется. Редким исключением являются модели, учитывающие связывание ЛС с белками крови, пассивную диффузию и активный транспорт в гепатоциты (в зависимости от уровня свободной фракции ЛС в крови), связывание с клеточными белками, метаболизм и активный выход ЛС в желчь [6]. Более строгие модели должны также учитывать взаимодействие ЛС с эритроцитами [7].

Белки плазмы крови, определяющие связывание химических веществ. Среди белков плазмы наиболее важными с точки зрения фармако(токсико)кинетики являются альбумин и альфа-1 кислый гликопротеин (АГК, орозомукоид-1); в меньшей степени кинетику определяют глобулины и липопротеины [8]. С альбумином связываются преимущественно анионы и нейтральные соединения, а с АГК – преимущественно катионы [9]. Низкомолекулярные ЛС, образующие нековалентные комплексы с альбумином и другими белками плазмы, могут в значительной степени избегать гломерулярную фильтрацию в почках и ферментативную биотрансформацию в печени и кровеносном русле.

Альбумин – основной белок плазмы крови с молекулярной массой 67 кДа, его концентрация составляет от 500 до 700 мкМ. Это лишь 1/3 всего количества альбумина в организме человека, 2/3 находятся в межклеточной жидкости и коже. Лигандами альбумина выступают различные молекулы как эндогенного, так и экзогенного происхождения: билирубин, свободные жирные кислоты (СЖК), гормоны, соли желчных кислот, трансферрин, окись азота, аспирин, варфарин, фенобутазон, клофибрат, фенитоин и другие ЛС и токсины [10]. Степень гидрофобности соединения – один из важнейших параметров, определяющих его связывание с альбумином, так как сайты связывания альбумина состоят в основном из гидрофобных остатков [11].

АГК – один из белков острой фазы с молекулярной массой 41–45 кДа. Белок сильно гликозилирован: около 45% его массы составляют углеводные остатки, количество и состав которых может меняться в зависимости от наличия воспалительных процессов [12]. Отрицательный заряд АГК (pI = 2,7–3,2) обусловливают сиаловые кислоты, находящиеся на его поверхности. Концентрация АГК в норме в плазме колеблется от 9 до 23 мкМ. При воспалительном процессе концентрация АГК возрастает в разы, что свидетельствует о защитной функции белка [2]. В отличие от альбумина, для которого показана слабая этническая зависимость по связыванию ЛС (особенно кислых), в целом более высокий уровень АГК у европейцев по сравнению с другими этническими группами обусловливает пониженный уровень свободной фракции лекарственных средств в их плазме [15].

В фармако(токсико)кинетических исследованиях следует учитывать изменения уровня связывающих белков, а также изменение сродства или количества сайтов связывания. Альбумин, так же как и АГК, является острофазным белком, но со знаком минус (так называемый отрицательный острофазный белок).

Гончаров Николай Васильевич (Goncharov Nikolay Vasilievich), доктор биол. наук, вед. науч. сотр. НИИГПЭЧ ФМБА России, вед. науч. сотр. ИЭФБ им. И.М. Сеченова РАН ngoncharov@gmail.com;
Прокофьева Дарья Станиславовна (Prokofieva Daria Stanislavovna), канд. биол. наук, ст. науч. сотр. НИИГПЭЧ ФМБА России darija-p1@yandex.ru;
Сорокоумов Павел Николаевич (Sorokoumov Pavel Nikolaevich), мл. науч. сотр. НИИГПЭЧ ФМБА России, Sorokoumov_pavel@mail.ru

Гипоальбуминемия – признак заболеваний печени, почечной недостаточности, нефротического синдрома, гипертиреоидизма, ревматоидного артрита, ожогов, недоедания и др. [14]. АГК может варьировать в широких пределах при таких заболеваниях и состояниях, как цирроз, нефротический синдром, рак, болезнь Крона, воспалительные процессы, заболевания сердца, ревматоидный артрит, ожирение, стресс и др. [14, 15]. Основными эндогенными лигандами, влияющими на связывание ЛС с альбумином и АГК, являются билирубин и свободные жирные кислоты [16]. Связь с белками также обусловлена генетическими модификациями альбумина [17] и АГК [18], гетерогенностью гликановой структуры или степенью сиалирования гликанов АГК [9].

Методическая основа определения связывающей способности белков плазмы по отношению к различным веществам. Определение фармако(токсико)кинетических/динамических характеристик веществ предполагает исследование связывающей способности плазмы крови по отношению к этим веществам. В настоящее время решением вопросов фармако- и токсикокинетики ЛС занимаются отдельные химико-аналитические компании с использованием высокочувствительного оборудования. Методология оценки связывающей способности белков плазмы основана на физическом разделении фракций с последующим количественным определением связанной и/или несвязанной фракции ЛС посредством инструментальных химико-аналитических методов. Основными методами, позволяющими фракционировать свободные и связанные с белками химические вещества, являются равновесный диализ (РД), ультрафильтрация (УФ) и ультрацентрифугирование (УЦ). Так, именно эти три метода находятся на вооружении одной из наиболее крупных химико-аналитических компаний – MicroConstants [19]. Из других методов отметим гель-фильтрацию, диафильтрацию, связывание с микросферами альбумина, круговой дихроизм, микрораспределение, микроэкстракцию, оптические биосенсоры [7, 20]. Если задача состоит в определении сайтов и/или констант связывания для отдельных белков, часто используют систему Biacore, принцип работы которой основан на оптическом эффекте поверхностного плазмонного резонанса [21]. В настоящее время разрабатываются новые методы высокопроизводительного полуавтоматического диализа в планшетном варианте [22].

Обычно измерение свободной фракции ЛС проводят в широком диапазоне концентраций, чтобы определить насыщение. При этом следует учитывать терапевтический диапазон доз, который не всегда сопоставим с насыщающей концентрацией ЛС. Величина погрешности метода для определения несвязанного с белками вещества особенно важна при работе с насыщающими концентрациями. Так, при связывании 99,8% вещества абсолютная ошибка 0,1% в определении свободного вещества дает неопределенность 50%. Если «терапевтическое окно» препарата достаточно узкое, такая неопределенность может стать причиной серьезной ошибки при определении безопасной дозы [7]. Минимальную ошибку в таких случаях дают высокопрецизионные и чувствительные методы, такие как жидкостная хроматография в сочетании с масс-спектрометрией и радиолигандный анализ. Необходимо подчеркнуть, что определение низких концентраций (на уровне нг/мл) свободной фракции любого лиганда в крови – довольно сложная техническая задача. Особенно остро эта проблема заявила о себе с появлением методов комбинаторной химии и молекулярного моделирования, благодаря которым новые потенциальные ЛС обладают повышенной липофильностью и сродством к белкам крови [11, 23].

Наиболее распространенным методом определения несвязанной с белками фракции является жидкостная хроматография с тандемным масс-спектрометрическим детектированием (ЖХ-МС/МС), а если доступно меченое соединение – то жидкостной сцинтилляционный счетчик. ЖХ-МС/МС позволяет повысить производительность метода благодаря одновременному измерению нескольких соединений в одном пулированном образце [24]. Однако чувствительность масс-спектрометрии зависит от степени ионизации соединения, которая может значительно варьировать даже среди структурных аналогов [23]. Определение с помощью жидкостного сцинтиллятора лишено этих недостатков и позволяет проводить количественный анализ самых разных веществ в сложных матрицах. Однако у метода есть свои недостатки, главными из которых являются наличие радиоактивных примесей и нестабильность меченого соединения, что в итоге может привести к завышенной оценке уровня несвязанного ЛС. Чтобы этого избежать, необходимо проводить измерения радиоактивной метки до и после разделения фракций [25].

Методы фракционирования: преимущества и недостатки. Для начала следует остановиться на рассмотрении общих ограничений всех методов фракционирования, а затем перейти к обсуждению каждого метода в отдельности. Для оценки связывающей способности белков плазмы следует использовать свежие образцы плазмы или цельной крови. Хотя показано, что замораживание/оттаивание плазмы незначительно влияет на связывание ЛС с белками [26], длительное хранение плазмы не рекомендуется, так как липолиз триглицеридов приводит к увеличению уровня СЖК [27], что может привести к изменению конформации альбумина и сродства к нему ЛС [28]. В процессе разделения фракций следует помнить о необходимости поддержания равновесных условий, так как известно, что на оценку связывающей способности белков плазмы влияют различные экспериментальные факторы, такие как концентрация ЛС и белка, pH, температура, стабильность комплекса ЛС-белок и т.д. [29]. Например, небольшие изменения pH или температуры могут в 2 раза изменить уровень свободной фракции пропранолола [40]. Если мониторинг pH невозможен (длительное время инкубации, использование пулированного образца), необходимо оценивать емкость диализного буфера [32]. Контроль температуры – важнейшее условие поддержания равновесия, особенно для длительно протекающего РД, так как количество свободного лиганда возрастает с повышением температуры [26]. Плохая растворимость ЛС в воде – еще один фактор, который может ограничить применение методов фракционирования. Некоторые органические растворители могут оказывать влияние на процесс связывания. Например, ацетонитрил конкурирует с некоторыми ЛС за низкоаффинные места связывания на альбумине и другими белками крови [30]. Связывающую способность белков плазмы по отношению к некоторым веществам (например, хинидину) может снизить присутствие гепарина и хлорид-ионов буфера [31]. Однако понизив концентрацию гепарина с 20 до 5 Ед/мл, можно обеспечить антикоагулянтный эффект без влияния на связывание препарата белками. Необходимо помнить, что фармацевтический альбумин, применяемый для поддержания или повышения осмотического давления, имеет пониженную связывающую способность по сравнению с нефармацевтическим альбумином или сывороткой крови человека [32]. Это обусловлено присутствием стабилизаторов (каприловая кислота и N-ацетил-DL-триптофан), которые добавляют к альбумину перед пастеризацией.

Равновесный диализ (РД). Несмотря на имеющиеся недостатки, в настоящее время это наиболее распространенный метод определения процента связывания и констант связывания веществ с белками. Перед проведением собственно исследования необходимо определить время достижения равновесия. Чем выше молекулярный вес соединения и чем сильнее его связывание с белками, тем больше времени требуется; равновесие достигается быстрее, если исследуемое соединение добавлять в камеру с белком, а не с буфером, и после этого систему встряхивать [33, 34]. Если для достижения равновесия требуется слишком большое время, велика вероятность ошибки вследствие бактериального пророста, перераспределения водной фазы, сдвига pH, повышения уровня свободных жирных кислот в пробе [35]. По достижении равновесия общая концентрация ЛС определяется в той части пробы, где находится белок (плазма), а концентрация свободного ЛС определяется, соответственно, в другой части, где находится ЛС в буфере. С целью повышения производительности метода в настоящее время разработаны 96-луночные планшеты с вертикальными сменными камерами-вставками, открытыми сверху, что позволяет брать пробы с обеих сторон мембраны и определять степень извлечения и неспецифическое связывание. Предел отсечения мембран составляет обычно 5–12 кДа.

Из недостатков метода РД следует отметить сдвиги в начальных условиях равновесия, неспецифическое связывание, изменение объема в камерах, эффект Доннана, утечку белка через мембрану [36]. Разница между первоначальной общей концентрацией ЛС и общей концентрацией ЛС при достижении равновесия выше для соединений с низкой аффинностью к белкам плазмы; иногда это важно, если нужно установить первоначальную свободную концентрацию ЛС, так как фактически вычисляют концентрации после достижения равновесия [37]. Неспецифическое связывание с мембраной или другими компонентами системы приводит к заниженной оценке концентрации свободного ЛС. В настоящее время компоненты аналитических систем делают из тефлона, чтобы минимизировать неспецифическое связывание. Ошибку, обусловленную неспецифическим связыванием, можно уменьшить, если анализировать раствор по обе стороны мембраны [33]. Иногда для этой цели прибегают к другим методам оценки связывания – УФ или УЦ.

В случае высокого коллоидного осмотического давления в камере с белком наблюдаются изменения объема [38]. Эти изменения сказываются на равновесии соединений с низкой аффинностью, и степень этих изменений возрастает с увеличением времени достижения равновесия до 4 часов и более, хотя их можно корректировать математически [39]. Если изменения объема не превышают 10%, то обусловленными эффектами можно пренебречь [40]. Иногда для установления осмотического баланса в камеру с буфером добавляют декстран [41].

Эффект Доннана актуален при работе с высокоионизированными и низкоаффинными ЛС. Неравномерное распределение проникающих ионов между двумя камерами обусловлено наличием непроникающих ионизированных молекул белка [42]. Если соотношение Доннана известно, то эффект можно корректировать. Кроме того, эффект можно минимизировать повышением концентрации электролитов в диализате (исходном растворе). Однако надо иметь в виду, что некоторые ионы могут конкурировать с ЛС за места связывания [43].

Еще одной проблемой может стать утечка белков через мембрану, что может значительно повысить кажущийся уровень несвязанной фракции, особенно соединений с высокой аффинностью. Например, при исследовании соединения, на 90% связанного с белками, 1% утечка белка дает ошибку в оценке свободной фракции 9% [33]. Эта причина ошибки сводится к минимуму при использовании микропланшетных диализных RED-систем (Rapid Equilibrium Dialysis), время достижения равновесия в которых составляет 4 ч.

Ультрафильтрация (УФ). Подобно РД, в методе УФ используется двухкамерная емкость, разделенная полупроницаемой мембраной. Раствор белка с исследуемым веществом помещается в верхнюю камеру и центрифугируется (обычно при 2000 g), при этом несвязанная фракция перемещается в нижнюю камеру. По сравнению с РД, метод УФ занимает гораздо меньше времени и технически более прост. Вследствие этого снижены ошибки, обусловленные липолизом, разбавлением и/или утечкой белка через мембрану. Существует довольно распространенное заблуждение, будто при фильтрации смещается равновесие, в связи с чем рекомендуют отбирать для анализа не более 10% ультрафильтрата. Однако уже давно доказано, что равновесное связывание не меняется при УФ, даже если концентрация белка возрастает в 2 раза [33, 44]. Метод, конечно, имеет свои недостатки, главным из которых является неспецифическое связывание свободного ЛС с мембраной фильтра или внутренней поверхностью собирательной камеры [30, 45, 46]. Особенно эта проблема стала актуальной с возрастанием количества потенциальных ЛС, имеющих выраженные липофильные свойства. Попытки решения этой проблемы заключались в изготовлении мембран из полисульфона [47] и прекондиционировании мембранных фильтров с ультрафильтратом сыворотки [45]. Желаемого улучшения, однако, не было получено; в то же время определенное снижение неспецифического связывания было достигнуто в результате обработки мембранных фильтров с помощью либо Tween-80 для тестирования нейтральных или кислых соединений, либо хлоридом бензалкония для тестирования основных соединений [48]. Среди других способов уменьшения неспецифического связывания – обработка собирательной камеры контрольной плазмой, не прошедшей через фильтр [49]. Также следует отметить использование 0,1% Tween-20 для обработки наконечников пипеток и собирательных камер с целью уменьшения неспецифической сорбции [50].

Другой недостаток метода УФ – эффект молекулярного отсеивания, суть

которого состоит в том, что вода плазмы и низкомолекулярные соединения проходят через мембрану с разной скоростью, что обусловливает снижение количества несвязанного ЛС в анализируемой пробе [51]. Эффект усиливается с повышением молекулярного веса вещества и прилагаемого давления. Кроме того, метод УФ имеет недостатки, присущие методу РД: эффект Доннана и утечка белка [51]. И последнее (но от этого не менее важное): при УФ гораздо труднее, чем при РД, контролировать pH и температуру. Иногда получается замкнутый круг: стремление приблизить температуру к физиологической приводит к усилению испарения, что вынуждает снижать температуру при центрифугировании [52].

Ультрацентрифугирование (УЦ). Разделение свободной и связанной фракций при УЦ обеспечивается не мембраной, а действием большой гравитационной силы (до 625000 g) при центрифугировании на сверхвысоких оборотах [53]. Вещества, связанные с плотными макромолекулами (альбумин, АГК, липопротеины высокой и низкой плотности и др.) оседают, хиломикроны и липопротеины очень низкой плотности остаются на поверхности, а несвязанное вещество содержится в жидкой фракции под липидным слоем [7]. Преимущество метода УЦ перед «мембранными» методами РД и УФ – низкий уровень неспецифического связывания с внутренней поверхностью пробирки. Однако недостатков гораздо больше. Метод требует дорогостоящего оборудования и отличается низкой производительностью. Несмотря на возможность поддержания температуры в камере, полностью поддерживать физиологические условия не удается: так, pH при центрифугировании повышается с 7,4 до 7,8–8,0 [53]. Отмечают контаминацию «свободной» фракции белками и липопротеинами вследствие либо неполного разделения, либо смешения слоев при взятии образца из пробирки [53, 54]. Такие факторы, как время и – под вопросом – скорость центрифугирования, также вносят погрешность в оценку связывающей способности белков плазмы. В целом же считается, что снизить погрешность оценки можно, если центрифугировать при 37^{0}C с максимально возможной скоростью минимально возможное время [7].

Общие рекомендации по проведению оценки связывания ЛС белками

Несмотря на то что в практическом аспекте плазма крови предпочтительнее цельной крови, для оценки связывания ЛС лучше использовать цельную кровь. Информативность снижается в ряду: цельная кровь, плазма крови, белковая фракция, чистый белок.

Исследование связывания ЛС с белками крови необходимо проводить при физиологических значениях pH, температуры, осмотичности.

Необходимо уточнить возможность влияния на процесс связывания растворителей и компонентов буферных растворов.

При проведении исследований следует использовать такие концентрации ЛС, которые лежат в пределах физиологических доз.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Сергеев П.В., ред*. Биохимическая фармакология: Учеб. пособие для вузов. М.: Высшая. школа; 1982.
2. *Israili Z.H., Dayton P.G.* Human alpha-1-glycoprotein and its interactions with drugs Drug Metab. Rev. 2001;
33 (2): 161–235.
3. *Smith D.A. et al*. The effect of plasma protein binding on in vivo efficacy: misconceptions in drug discovery. Nat. Rev. Drug Discov. 2010; 9 (12): 929–939.
4. *Liu X. et al.* Do we need to optimize plasma protein and tissue binding in drug discovery? Curr. Top. Med. Chem. 2011; 11 (4): 450–466.
5. *Boxenbaum H.* Pharmacokinetics: philosophy of modeling. Drug Metab. Rev. 1992; 24 (1): 89–120.
6. *Baker M., Parton T.* Kinetic determinants of hepatic clearance: plasma protein binding and hepatic uptake. Xenobiotica. 2007; 37 (10–11): 1110–1134.
7. *Howard M.L. et al*. Plasma protein binding in drug discovery and development. Comb. Chem. High Throughput Screen. 2010; 13 (2): 170–187.
8. *Tozer T.N., Rowland M.* Introduction to pharmacokinetics and pharmacodynamics: the quantitative basis of drug therapy. Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins; 2006.
9. *Fournier T. et al*. Alpha-1-acid glycoprotein. Biochim. Biophys. Acta. 2000; 1482 (1–2): 157–171.
10. *Fasano M. et al.* The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin. IUBMB Life. 2005; 57 (12): 787–96.
11. *Colmenarejo G. et al*. Cheminformatic models to predict binding affinities to human serum albumin. J. Med. Chem. 2001; 44 (25): 4370–4378.
12. *Ceciliani F., Pocacqua V.* The acute phase protein alpha1-acid glycoprotein: a model for altered glycosylation during diseases. Curr. Protein Pept. Sci. 2007; 8 (1): 91–108.
13. *Johnson J.A.* Predictability of the effects of race or ethnicity on pharmacokinetics of drugs. Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. 2000; 38 (2): 53–60.
14. *Dasgupta A.* Clinical utility of free drug monitoring. Clin. Chem. Lab. Med. 2002; 40 (10): 986–993.
15. *Roy L. et al*. Quinine pharmacokinetics in chronic haemodialysis patients. Br. J. Clin. Pharmacol. 2002; 54 (6): 604–609.
16. *Ghuman J. et al.* Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin. J. Mol. Biol. 2005; 353 (1): 38–52.
17. *Kragh-Hansen U. et al*. Binding of warfarin, salicylate, and diazepam to genetic variants of human serum albumin with known mutations. Mol. Pharmacol. 1990;
37 (2): 238–242.
18. *Colombo S. et al.* Swiss HIV Cohort Study. Orosomucoid (alpha1-acid glycoprotein) plasma concentration and genetic variants: effects on human immunodeficiency virus protease inhibitor clearance and cellular accumulation. Clin. Pharmacol. Ther. 2006; 80 (4): 307–318.
19. Avaible at: http://www.microconstants.com/
20. *Pacifici G.M., Viani A.* Methods of determining plasma and tissue binding of drugs. Pharmacokinetic consequences. Clin. Pharmacokinet. 1992; 23 (6): 449–468.
21. *Jason-Moller L. et al.* Overview of Biacore systems and their applications. Curr. Protoc. Protein Sci. 2006; Chapter 19: Unit 19.13.
22. *van Liempd S. et al*. Development and validation of a higher-throughput equilibrium dialysis assay for plasma protein binding. J. Lab. Autom. 2011; 16 (1): 56–67.
23. *Kerns E.H., Di L.* Utility of mass spectrometry for pharmaceutical profiling applications. Curr. Drug Metab. 2006; 7 (5): 457–466.
24. *Wan H., Rehngren M.* High-throughput screening of protein binding by equilibrium dialysis combined with liquid chromatography and mass spectrometry. J. Chromatogr. A. 2006; 1102 (1–2): 125–134.
25. *Pedersen J.B., Lindup W.E.* Interpretation and analysis of receptor binding experiments which yield non-linear Scatchard plots and binding constants dependent upon receptor concentration. Biochem. Pharmacol. 1994; 47 (2): 179–185.
26. *Kristensen C.B., Gram L.F.* Equilibrium dialysis for determination of protein binding or imipramine-evaluation of a method. Acta Pharmacol. Toxicol. (Copenh). 1982; 50 (2): 130–136.
27. *Menéndez L.G. et al.* Effect of storage of plasma and serum on enzymatic determination of non-esterified fatty acids. Ann. Clin. Biochem. 2001; 38: 252–255.
28. *Dawidowicz A.L., Kalitynski R.* Effects of intraoperative fluid infusions, sample storage time, and sample handling on unbound propofol assay in human blood plasma. J. Pharm. Biomed. Anal. 2005; 37 (5): 1167–1171.
29. *Hinderling P.H., Hartmann D.* The pH dependency of the binding of drugs to plasma proteins in man. Ther. Drug Monit. 2005; 27 (1): 71–85.
30. *Bombardt P.A. et al*. Protein binding of tirilazad (U-74006) in human, Sprague-Dawley rat, beagle dog and cynomolgus monkey serum. J. Pharmacol. Exp. Ther. 1994; 269 (1): 145–150.
31. *Guentert T.W., Oie S.* Factors influencing the apparent protein binding of quinidine. J. Pharm. Sci. 1982; 71 (3): 325–328.
32. *Olsen H. et al*. Pharmaceutical-grade albumin: impaired drug-binding capacity in vitro. BMC Clin. Pharmacol. 2004; 4: 4.
33. *Bowers W.F. et al*. Ultrafiltration vs equilibrium dialysis for determination of free fraction. Clin Pharmacokinet. 1984; 9: 49–60.
34. *Bayne W.F., Hwang S.S.* Effect of nonlinear protein binding on equilibration times for different initial conditions. J. Pharm. Sci. 1985; 74 (2): 120–123.
35. *Albani F. et al*. Free fraction of valproic acid: in vitro time-dependent increase and correlation with free fatty acid concentration in human plasma and serum. Epilepsia. 1983; 24 (1): 65–73.
36. *Wright J.D. et al*. Measurement and analysis of unbound drug concentrations. Clin. Pharmacokinet. 1996; 30 (6): 445–462.
37. *Chadwick C. et al*. Potential methodological errors in the application of equilibrium dialysis to the determination of «free» and «bound» plasma tryptophan. Clin. Chim. Acta. 1979; 99 (3): 279–282.
38. *Huang J.D.* Errors in estimating the unbound fraction of drugs due to the volume shift in equilibrium dialysis.
J. Pharm. Sci. 1983; 72 (11): 1368–1369.
39. *Lima J.J. et al*. Influence of volume shifts on drug binding during equilibrium dialysis: correction and attenuation. J. Pharmacokinet. Biopharm. 1983; 11 (5): 483–498.
40. *Banker M.J. et al.* Development and validation of a 96-well equilibrium dialysis apparatus for measuring plasma protein binding. J. Pharm. Sci. 2003; 92 (5): 967–974.
41. *Kariv I. et al.* Development of a high throughput equilibrium dialysis method. J. Pharm. Sci. 2001; 90 (5): 580–587.
42. *Mapleson W.W.* Computation of the effect of Donnan equilibrium on pH in equilibrium dialysis. J. Pharmacol. Methods. 1987; 17 (3): 231–242.
43. *van der Giesen W.F., Wilting J.* New aspects of free drug concentration determination in human serum with equilibrium dialysis. Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol. 1982; 4 (6): 417–423.
44. *Judd R.L., Pesce A.J.* Free drug concentrations are constant in serial fractions of plasma ultrafiltrate. Clin. Chem. 1982; 28 (7): 1726–7.
45. *Singh S.S., Mehta J.* Measurement of drug-protein binding by immobilized human serum albumin-HPLC and comparison with ultrafiltration. J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 2006; 834 (1–2): 108–116.
46. *Blanchard J., Harvey S.* Comparison of ultrafiltration devices for assessing theophylline protein binding. Ther. Drug Monit. 1990; 12 (4): 398–403.
47. *Lee K.J. et al.* Modulation of nonspecific binding in ultrafiltration protein binding studies. Pharm. Res. 2003; 20 (7): 1015–1021.
48. *Taylor S., Harker A.* Modification of the ultrafiltration technique to overcome solubility and non-specific binding challenges associated with the measurement of plasma protein binding of corticosteroids. J. Pharm. Biomed. Anal. 2006; 41 (1): 299–303.
49. *Zhong R. et al.* High-performance liquid chromatographic method for the quantification of unbound evernimicin inhuman plasma ultrafiltrate. J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 2002; 772 (1): 191–195.
50. *Kurz H. et al*. Evaluation of methods to determine protein-binding of drugs. Equilibrium dialysis, ultrafiltration, ultracentrifugation, gel filtration. Arzneimittelforschung. 1977; 27 (7): 1373–1380.
51. *Zhang J., Musson D.G.* Investigation of high-throughput ultrafiltration for the determination of an unbound compound in human plasma using liquid chromatography and tandem mass spectrometry with electrospray ionization. J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 2006; 843 (1): 47–56.
52. *Verbeeck R.K., Cardinal J.A.* Plasma protein binding of salicylic acid, phenytoin, chlorpromazine, propranolol and pethidine using equilibrium dialysis and ultracentrifugation. Arzneimittelforschung. 1985; 35 (6): 903–906.
53. *Nakai D. et al.* Evaluation of the protein binding ratio of drugs by a micro-scale ultracentrifugation method.
J. Pharm. Sci. 2004; 93 (4): 847–854.

N.V. Goncharov [1,2], D.S. Prokofieva[2], P.N. Sorokoumov[2]

Interaction of chemical substances with blood plasma proteins: methodological problems of pharmaco- and toxicokinetics

[1] [1]I.M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences (IEPhB RAS), 194223, Saint Petersburg, Russian Federation
[2] Federal Unitary Enterprise «Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology», Federal Medical Biological Agency of Russia, 188663, Saint Petersburg, Russian Federation

A survey featuring up-to-date ideas about binding ability of macromolecules of the organism in relation to xenobiotics is presented. Existing and intensively developing methods for assessment of interaction between macromolecules and xenobiotics are highlighted in detail. General recommendations to perform analyses are set forth.

Key words: *fractionation, plasma, binding.*

Материал поступил в редакцию 06.05.2013 г.

УДК 54.1: 615.91

Биологические эффекты многослойных углеродных нанотрубок при легочной экспозиции in vivo

Т.О. Халиуллин[1], Е.Р. Кисин[2], Р.Р. Залялов[1], А.А. Шведова[2], Л.М. Фатхутдинова[1]

[1]ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет Минздрава РФ», 420111, г. Казань
[2]National Institute for Occupational Safety and Health, NIOSH, 26505, Morgantown, USA

Однократное введение 40 мкг многослойных углеродных нанотрубок (МУНТ) мышам линии C57BL/6 методом фарингеальной аспирации привело к возникновению локального воспалительного ответа с развитием фибротического процесса в ткани легкого. Воспалительные изменения характеризовались значительным увеличением, по сравнению с контролем, количества нейтрофилов в лаважной жидкости, повышением общего белка, уровня лактат-дегидрогеназы и цитокинов IL-6, MCP-1, TNF-a через 24 часа после экспозиции. Был показан фиброгенный потенциал исследуемых МУНТ, что подтверждается высоким уровнем TGF-b с 7-го дня и до конца эксперимента. В легких обнаружены гранулемы и участки фиброза (28-й день). Полученные данные не исключают возможности развития системного ответа. Предполагая наличие потенциального риска здоровью работников, подвергающихся воздействию аэрозоля МУНТ на рабочих местах, считаем, что необходимы дальнейшие исследования, которые позволят определить класс опасности, допустимые уровни и необходимость отнесения МУНТ, как отдельных аллотропных модификаций углерода, к веществам (аэрозолям) преимущественно фиброгенного действия.

Ключевые слова: *углеродные нанотрубки; фиброз, in vivo, легочная экспозиция.*

Введение. Углеродные нанотрубки (УНТ) представляют собой свернутые листы графена (двумерная аллотропная модификация углерода). В зависимости от количества структурообразующих листов графена принято выделять одно- и многослойные УНТ. Спектр возможного применения этих наночастиц весьма широк – по прочностным характеристикам они превосходят сталь, обладают высокой тепло- и электропроводностью [1]. Сегодня в мире наблюдается стабильное увеличение количества предприятий наноиндустрии, в том числе и тех, что имеют дело с углеродными нанотрубками. Мировой рынок УНТ достиг $192 миллионов в 2011 году. В 2012 году ожидаемый совокупный доход составляет $239 миллионов долларов. Динамика рынка дает основания предполагать рост до $527 миллионов долларов в 2016 году со среднегодовым темпом 22,4% [2].

Предварительное изучение этого сегмента отрасли наноиндустрии (анкетный опрос, интервью во время международных выставок, проводимых под эгидой ОАО «РОСНАНО») показало, что производство УНТ в России представлено в основном малыми предприятиями с числом работающих до 20 человек, из них около половины работников потенциально подвержены воздействию аэрозолей УНТ на рабочих местах. Ингаляционный путь поступления в организм для аэрозолированных УНТ на рабочих местах представляется наиболее вероятным, в сравнении с перкутанным и пероральным [3].

Целью исследования было изучить фиброгенный потенциал исследуемых МУНТ в ходе аспирационного эксперимента на животных.

Материалы и методы исследования. В качестве объекта исследования были выбраны многослойные углеродные нанотрубки, полученные промышленным методом каталитического осаждения паров. Физико-химические характеристики МУНТ приведены в таблице 1.

Для исследований были взяты двухмесячные мыши линии C57BL/6J (Jackson laboratories), самки, масса тела 18±2 г. Животные были разделены на контрольную и опытную группы по 30 мышей в каждой. Работа с экспериментальными животными соответствует нормативной отечественной документации [4]. Экспонированная группа получила путем фарингеальной аспирации 40 мкг МУНТ; контрольной группе тем же способом был введен фосфатно-буферный раствор (ФБР).

Затравка была осуществлена методом фарингеальной аспирации (ФА). Мыши были анестезированы 0,1%-ным раствором кетамина/ксилазина, после мышечного расслабления и потери подвижности мышь фиксировалась в вертикальной позиции, язык оттягивался пинцетом, к корню языка помещались 40 мкл суспензии МУНТ в ФБР (1мг/мл), которые затем рефлекторно вдыхались животным. При квалифицированном проведении процедуры практически весь объем затравочного материала поступает в дыхательные пути, минуя пищевод [5, 7]. Далее мышь наблюдалась в течение 3 минут и переносилась в клетку. Все мыши благоприятно перенесли процедуру и восстановились в течение 30–45 минут.

В отличие от интратрахеальной инстилляции взвесей твердых частиц, фарингеальная аспирация не приводит к обтурации просвета крупных бронхов. В частности, Lakatos и соавт. [5] провели сравнительный эксперимент на мышах (модель силикоза) и показали, что при интратрахеальной инстилляции происходила закупорка воздухоносных путей, возникали одиночные участки повреждения легочной ткани и фиброза; при использовании метода фарингеальной аспирации затравочный материал равномерно распределялся в объеме легких. Carrero-Sanchez и соавт. [6] наблюдали гибель животных при экспозиции МУНТ методом интратрахеального введения из-за закупорки воздухоносных путей.

Ранее Shvedova и соавт. [7] установили, что распределение УНТ в легких и ответные реакции организма животных при фарингеальной аспирации сопоставимы с ингаляционным экспериментом.

Затравочная доза в 40 мкг/мышь соответствует депонированной дозе 800 мкг на 1 м^2 альвеолярного эпителия (площадь поверхности альвеолярного эпителия у мышей равна 0,05 м^2 [8]). Специфических моделей депонирования УНТ в легких человека не существует, поэтому для установления ориентировочных депонированных доз применялась модель MPPD [9]. При расчете были использованы следующие входные данные: концентрация аэрозоля МУНТ 1500 мкг/м^3, размер агломератов МУНТ 1,5 мкм, минутный объем дыхания 20 л/мин для легкой физической нагрузки [10]. Характеристики аэрозоля МУНТ, использованные в модели, основывались на результатах американских исследователей, которые установили, что диапазон концентраций для углеродных наноматериалов в воздухе рабочей зоны составляет 15–1800 мкг/м^3, при этом УНТ быстро агломерируют в воздухе, образуя структуры с размерами 0,3–4,5 мкм с медианным значением около 1,5 мкм [11, 12, 13]. В соответствии с этой моделью, с учетом поверхности альвеолярного эпителия человека 102 м^2 [8], поверхностная депонированная доза в 800 мкг/м^2 может накопиться в легких работника уже через 20–30 рабочих смен.

В каждой группе мыши были разделены на 3 подгруппы и подвергнуты эвтаназии на 1-й, 7-й и 28-й день после экспозиции путем инъекции летальной дозы пентобарбитала натрия.

Для проведения бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ) эвтаназированное животное помещалось на операционный столик и фиксировалось булавками. Обнажалась трахея, в ней проделывалось отверстие, через которое вводилась канюля, фиксируемая далее нитью. Через канюлю легкие лаважировались однократно ледяным ФБР (0,8 мл) для первой порции и затем несколько раз (до 5 мл) для второй. Супернатант первой порции использовался для биохимических исследований, клеточный осадок первой и второй порций окрашивался по Романовскому-Гимзе для подсчета клеток легких и оценки клеточного состава. В лаважной жидко-

Халиуллин Тимур Оскарович (Khaliullin Timur Oskarovich), кафедра гигиены , медицины труда ГБОУ ВПО КГМУ Минздрава России, Khaliullin.40k@gmail.com
Кисин Елена Рафаиловна (Kisin Elena Rafailovna), ассистент, биолог, NIOSH,edk8@cdc.gov
Залялов Рамиль Равилевич (Zalyalov Ramil Ravilevich), канд. мед. наук, старший преподаватель кафедры общей гигиены ГБОУ ВПО КГМУ Минздрава России, ramilzal@nm.ru
Шведова Анна Александровна (Shvedova Anna Aleksandrovna), доктор медицинских наук, руководитель лаборатории, NIOSH, ats1@cdc.gov
Фатхутдинова Лилия Минвагизовна (Fatkhutdinova Liliya Minvagizovna), доктор мед. наук, профессор кафедры гигиены, медицины труда ГБОУ ВПО КГМУ Минздрава России, liliafat@kcn.ru

Таблица 1

Физико-химические характеристики МУНТ, взятых для острого аспирационного эксперимента (по данным предприятия-производителя и собственных исследований)

Физико-химические характеристики МУНТ	Диапазон
Наружный диаметр, нм	8–15
Внутренний диаметр, нм	4–8
Длина, мкм	2 и более
Общий объем примесей, %	до 5
Насыпная плотность, г/ $см^3$	0,03–0,05
Удельная геометрическая поверхность, $м^2/г$	300–320
Термостабильность, °С	до 600

сти определялись лактатдегидрогеназа (ЛДГ), общий белок (ОБ), цитокины: IL-6, MCP-1, TNF-a, IFN-γ, IL-10, IL-12p70.

Забор крови производился после эвтаназии и вскрытия брюшной полости из нижней полой вены. В сыворотке крови определялся TGF-b.

У 5 мышей из каждой подгруппы легкие были извлечены, зафиксированы, гистологические срезы были окрашены гематоксилином-эозином, а также трихромом по Массону.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием t-теста для парных и непарных случаев (пакет Microsoft Excel 2010).

Результаты исследования. Экспонированные мыши имели в два раза меньший прирост массы тела в ходе эксперимента по сравнению с контрольной группой на 7-й и 28-й дни (рис. 1).

Однократная аспирация 40 мкг многослойных углеродных нанотрубок у мышей привела к возникновению локального воспалительного ответа, сменившегося развитием фибротических изменений в ткани легкого.

Через 24 часа после экспозиции наблюдалось значительное увеличение, по сравнению с контролем, количества нейтрофилов в лаважной жидкости, наряду с повышением общего белка, уровня ЛДГ и ряда воспалительных цитокинов – IL-6, MCP-1, TNF-a. (табл. 2).

На 7-й день имело место уже незначительное превышение маркеров воспаления по сравнению с контрольной группой, с приведением параметров к контрольному уровню на 28-й день (цифровые данные не приведены). Уровень TGF-b в сыворотке крови у экспонированных мышей увеличился в 2 раза к 7-му дню и оставался высоким вплоть до конца эксперимента (рис. 2).

На 28-й день гистологическая картина в легких характеризовалась наличием гранулем, в центре которых определялись агломерированные МУНТ, многочисленные альвеолярные макрофаги и фибробласты. Окраска трихромом по Массону выявила увеличение количества коллагеновых волокон (рис. 3).

В лаважной жидкости на 28-й день после экспозиции все еще наблюдалось большое количество макрофагов с хорошо заметными включениями МУНТ.

Обсуждение результатов. Значительный приток нейтрофилов в бронхоальвеолярной жидкости через 24 часа после введения МУНТ совпал с увеличением уровней воспалительных цитокинов TNF-a, IL-6 и MCP-1(CCL-2), что свидетельствует о развитии локального воспалительного ответа. Похожие эффекты уже были описаны ранее: Erdely и соавт. [14] и Shvedova и соавт. [15] показали, что МУНТ и ОУНТ при фарингеальной аспирации у мышей вызывают значительно более выраженный воспалительный ответ, чем фуллерены и сажа в дозах 10–40 мкг/мышь. Изучив изменения в экспрессии генов крови тканей сердечно-сосудистой системы, Erdely и соавт. [14] указали на связь локального воспалительного ответа в результате попадания ОУНТ и МУНТ с системными нарушениями, в том числе развитием атеросклероза, причем в качестве посредников выступали цитокины (IL-6, IL-1b, IL-33, CCL-2, CCL-4, CCL-22, CXCL2 и др.). Обнаруженные нами изменения цитокинового профиля согласуются с данными Erdely и соавт. [14] и свидетельствуют в пользу гипотезы о системных эффектах легочной экспозиции УНТ.

Увеличение ЛДГ и уровня общего белка свидетельствуют о клеточных повреждениях и повышении проницаемости мембран. Изменения, обнаруженные в первый день, практически исчезли к 7-му дню, что может быть обусловлено стиханием первичной воспалительной реакции.

В то же время на 7-й день в сыворотке крови резко увеличилось содержание TGF-b по сравнению с контролем, данный уровень сохранялся вплоть до конца эксперимента (28-й день). TGF-b – это белок, секретируемый многими клетками, в том числе макрофагами и эпителием, участвующий в пролиферации, клеточной дифференциации, апоптозе и во множестве других процессов, а также играющий роль в развитии фиброзов, опухолевых заболеваний, диабета, заболеваний сердечно-сосудистой системы и др. На сегодняшний день известны три его изоформы (b_1, b_2, b_3), в нашем исследовании у мышей оценивался уровень TGF-b_1, аналогичный человеческому. В опытах [15] с однослойными углеродными нанотрубками было показано увеличение TGF-b_1 в бронхо-альвеолярной жидкости мышей, получивших 20–40 мкг ОУНТ, на 7-й день эксперимента одновременно с нарастанием количества макрофагов до пикового уровня и возвращение к норме к 28-му дню. Увеличение содержания TGF-b совпало с обнаружением гранулематозных изменений в легких, участков фиброза с высоким содержанием коллагена (окраска трихромом по Массону). Обнаружение повышенных уровней TGF-b в сыворотке крови свидетельствует не только о локальных изменениях. По мнению некоторых авторов [16], этот белок, попадая в системный кровоток из легких в результате экспозиции к МУНТ, через циклооксигеназный путь ведет к повышению продукции простагландина и IL-10, приводя в итоге к дисфункции Т-клеток и нарушениям в общем иммунитете.

Необходимо указать на ограничения исследования. Хотя выбранная для фарингеальной аспирации доза в 40 мкг соотносится с условиями производственной экспозиции с точки зрения депонирования МУНТ в легочной ткани, соответствие является достаточно условным, т.к. предполагается накопление дозы у человека, а мышь получает ту же дозу (в пересчете на 1 $м^2$ эпителия) однократно. Тем не менее, даже после однократного введения, вплоть до конца эксперимента, в макрофагах, полученных из БАЛ экспонированных мышей и на гистологических срезах легких, микроскопически определялись скопления УНТ. Это может быть косвенным признаком персистирования исследуемых наночастиц. Об этом же говорят данные других исследователей [17, 18, 19, 20]. Таким образом, при условии равных депонированных доз можно предполагать сходные эффекты однократных и дробных экспозиций.

На основании наших данных и работ других авторов можно предположить наличие потенциального риска здоровью работников, подвергающихся воздействию аэрозоля МУНТ на рабочих местах. Необходимы дальнейшие исследования, включая хронические ингаляционные эксперименты и эпидемиологические наблюдения.

Заключение. Исследуемые МУНТ обладают провоспалительным потенциалом, вызывая кратковременный локальный воспалительный ответ.

Многослойные углеродные нанотрубки депонируются и сохраняются в легких мышей как минимум 28 дней, в том числе внутри альвеолярных макрофагов.

Был обнаружен фиброгенный потенциал исследуемых многослойных углеродных нанотрубок, что подтверждается высоким уровнем TGF-b с 7-го дня и до конца эксперимента и гистологической картиной наличия в легких гранулем и участков фиброза (28-й день).

Необходимы дальнейшие исследования, которые позволят определить класс опасности, допустимые уровни и необходимость отнесения УНТ, как отдельных аллотропных модификаций углерода, к веществам (аэрозолям) преимущественно фиброгенного действия.

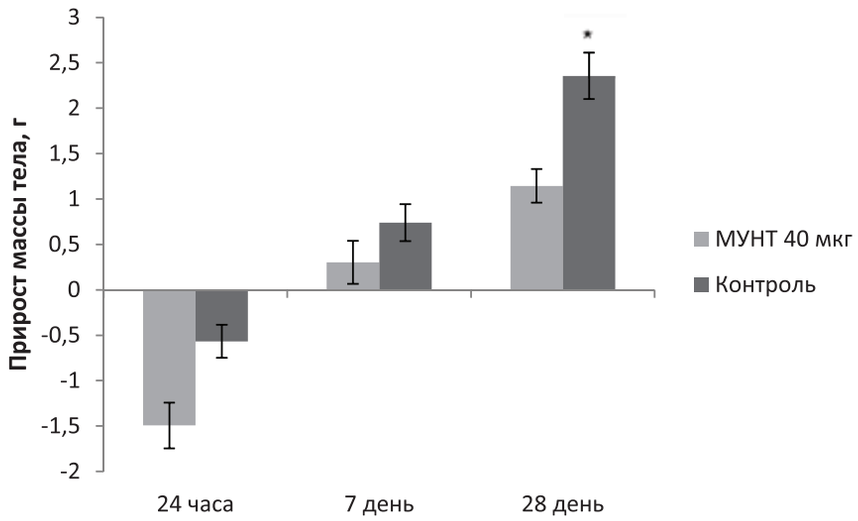


Рис. 1. Средний прирост массы тела мышей в ходе эксперимента. * - $p < 0.05$

Таблица 2

БАЛ, 24 часа после экспозиции к МУНТ или ФБР

	Нейтрофилы, % от общего числа клеток	ЛДГ, пг/мл	IL-6, пг/мл	MCP-1, пг/мл	TNF-a, пг/мл	IL-10, пг/мл	IL-12p70, пг/мл	IFN, пг/мл
МУНТ, 40 мкг	13±4,3*	69,1±1,9*	36,9±11,01*	30,3±6,5*	10,1±1,7*	44,9±5,4	29,6±8,5*	8,5±0,5
Контроль	0,6±0,23	34,7±1,1	3,2±0,47	19±0,42	6,3±0,7	44,5±1,1	12,4±3,2	8,7±0,5

Примечание. * $p < 0,05$.

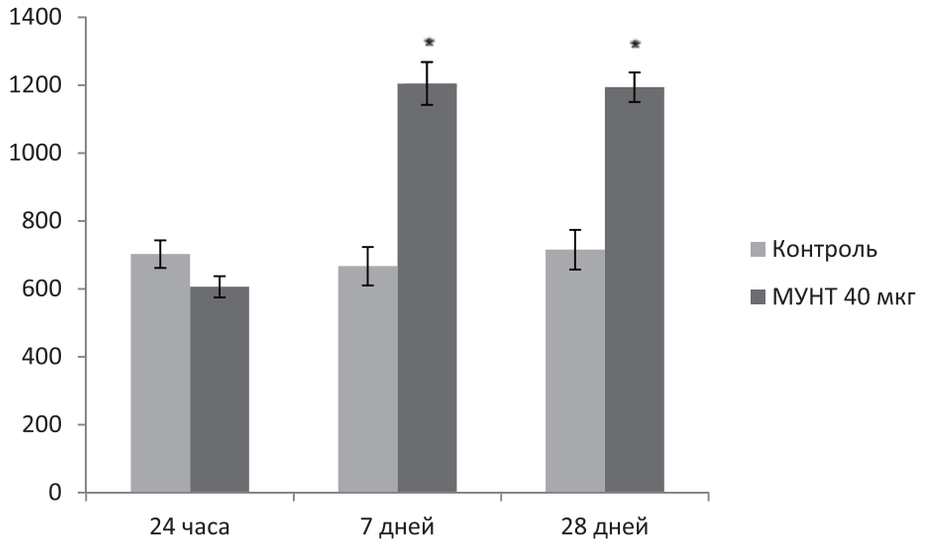


Рис. 2. Уровень TGF-b в сыворотке крови, пг/мл, * – $p < 0,05$

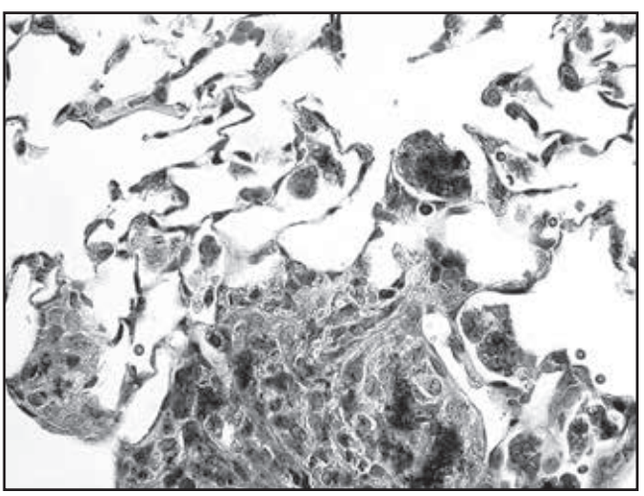


Рис. 3. Окраска среза легкого по Массону, 28-й день. МУНТ, 40 мкг, увеличение 40х

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Coleman, J.N., Khan, U., Blau, W.J., Gun'ko, Y.K.* Small but strong: A review of the mechanical properties of carbon nanotube-polymer composites. Carbon. 2006; 44. P. 1624–1652.
2. Доклад Global Markets and Technologies for Carbon Nanotubes. BCC Research. Market forecasting. Available at: http://www.bccresearch.com/report/carbon-nantubes-markets-technologies-nan024e.html
3. *Donaldson K., Aitken R., Tran L., Stone V., Duffin R., Forrest G. et al.* Carbon nanotubes: a review of their properties in relation to pulmonary toxicology and workplace safety. Toxicol Sci. 2006 Jul.; 92 (1). P. 5–22.
4. Национальный стандарт РФ ГОСТ Р 53434-2009 «Принципы наддежащей лабораторной практики». Утв. Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 2 декабря 2009 г. №544-ст. Доступ из справ.-правовой системы «ГАРАНТ».
5. *Lakatos H.F., Burgess H.A., Thatcher T.H., Redonnet M.R., Hernady E., Williams J.P. et al*. Oropharyngeal aspiration of a silica suspension produces a superior model of silicosis in the mouse when compared to intratracheal instillation. Exp Lung Res. 2006 May; 32(5). P. 181–199.
6. *Carrero-Sanchez J.C., Elías A.L., Mancilla R., Arrellín G., Terrones H., Laclette J.P. et al.* Biocompatibility and toxicological studies of carbon nanotubes doped with nitrogen. Nano Lett. 2006 Aug; 6(8). P. 1609–1616.
7. *Shvedova A.A., Kisin E., Murray A.R., Johnson V.J., Gorelik O., Arepalli S. et al.* Inhalation vs. aspiration of single-walled carbon nanotubes in C57BL/6 mice: inflammation, fibrosis, oxidative stress, and mutagenesis. Am J Physiol Lung Cell Mol. Physiol. 2008; Vol. 295(4).
P. 552–565.
8. *Stone, K.C., Mercer, R.R., Gehr, P., Stockstill, B., Crapo, J.D.* Allometric relationships of cell numbers and size in the mammalian lung. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 1992; Vol. 6. P. 235–243.
9. Human respiratory tract model for radiological protection. A report of a Task Group of the International Commission on Radiological Protection. Ann ICRP 1994; Vol. 24 (1–3). P. 1–482.
10. *de Winter-Sorkina R., Cassee F.R.* Multiple Path Particle Dosimetry Model (MPPD v 1.0): A Model for Human and Rat Airway Particle Dosimetry. National Institute for Public Health and the Environment (RIVM) Report; Bilthoven, Netherlands; 2002.
11. *Methner M.M.* Engineering case reports. Effectiveness of local exhaust ventilation (LEV) in controlling engineered nanomaterial emissions during reactor cleanout operations. J Occup Environ Hyg 2008; Vol. 5(6). P. 63–69.
12. *Methner, M.M., Birch M.E., Evans D.E.* Case study: Identification and characterization of potential sources of worker exposure to carbon nanofibers during polymer composite laboratory operations. J. Occup. Environ. Hyg 2007; Vol. 4. P. 125–130.
13. *Maynard A.M., Kuempel E.D.* Airborne nanostructured particles and occupational health. J. Nanopart. Res. 2005; Vol. 7(6). P. 587–614.
14. *Erdely A., Hulderman T., Salmen R., Liston A., Zeidler-Erdely P.C., Schwegler-Berry D. et al*. Cross-talk between lung and systemic circulation during carbon nanotube respiratory exposure. Potential biomarkers. Nano Lett 2009; Vol. 9 (1). P. 36–43.
15. *Shvedova, A.A., Kisin, E.R., Mercer, R., Murray, A.R., Johnson, V.J., Potapovich, A.I. et al*. Unusual inflammatory and fibrogenic pulmonary responses to single-walled carbon nanotubes in mice. Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol 2005; Vol. 289. P. 698–708.
16. *Mitchell L.A., Lauer F.T., Burchiel S.W., McDonald J.D.* Mechanisms for how inhaled multiwalled carbon nanotubes suppress systemic immune function in mice. Nat Nanotechnol 2009; Vol. 4(7). P. 451–456.
17. *Mercer R.R., Hubbs A.F., Scabilloni J.F., Wang L., Battelli L.A., Friend S. et al.* Pulmonary fibrotic response to aspiration of multi-walled carbon nanotubes. Part Fibre Toxicol 2011, Jul 22; Vol. 8. P. 21.
18. *Porter D.W., Hubbs A.F., Mercer R.R., Wu N., Wolfarth M.G., Sriram K et al.* Mouse pulmonary dose- and time course-responses induced by exposure to multi-walled carbon nanotubes. Toxicology 2010, Mar 10; Vol. 269 (2–3). P. 136–147.
19. *Li J.G., Li W.X., Xu J.Y., Cai X.Q., Liu R.L., Li Y.J. et al*. Comparative study of pathological lesions induced by multiwalled carbon nanotubes in lungs of mice by intratracheal instillation and inhalation. Environ Toxicol 2007 Aug; Vol. 22 (4). P. 415–421.
20. *Muller J., Huaux F., Moreau N., Misson P., Heilier J.F., Delos M. et al.* Respiratory toxicity of multiwall carbon nanotubes. Toxicol Appl Pharmacol 2005, Sep 15; Vol. 207 (3). P. 221–231.

T.O. Khaliullin[1], E.R. Kisin[2], R.R. Zalyalov[1], A.A. Shvedova[2], L.M. Fatkhutdinova[1]

Biological effects of pulmonary exposure to multiwalled carbon nanotubes in vivo

[1]Kazan State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Fedreation, 420012, Kazan, Russian Federation
[2]National Institute for Occupational Safety and Health, NIOSH, 26505, Morgantown, USA

A single administration of 40 μg multiwalled carbon nanotubes (MWCNTs) to C57BL/6 mice via pharyngeal aspiration led to an acute local inflammatory response with the development of the fibrotic process in the lung tissue. Inflammatory changes were characterized by a significant increase (compared to control) in the number of neutrophils in the lavage fluid, total protein, lactate dehydrogenase, as well as IL-6, MCP-1 and TNF-a 24 hours post exposure. The fibrogenic potential of investigated MWCNT has been shown, confirmed by high levels of TGF-b from the 7th day and untill the end of the experiment. Granulomas formation and fibrosis areas were revealed in the lungs on 28 day post-exposure. The data obtained do not exclude a possibility of systemic responses. Assuming potential health risk for workers exposed to MWCNT aerosol at the workplace, further studies are needed to determine the hazard class and threshold levels along with the necessity to refer MWNTs as specific allotropic modifications of carbon to substances (aerosols) with mainly fibrogenic activity.

Key words: *carbon nanotubes, fibrosis, in vivo, pulmonary exposure.*

Переработанный материал поступил в редакцию 08.05.2013 г.

УДК 547-3 : 543.9 :546.4

Сравнительный анализ концентрации металлотионеинов в плазме крови людей при использовании двух разных методов определения

Н.Л. Елаева[1], А.А. Иваненко[1], В.Д. Великова[1], В.А. Кашуро[1], А.М. Малов[1], Н.А. Соколян[2]

[1]ФГБУН «Институт токсикологии ФМБА России»,129019, г. Санкт-Петербург.
[2]ФГБУ «Санкт-Петербургский Научно-исследовательский психоневрологический институт им. В.М. Бехтерева», 129019, г. Санкт-Петербург.

Концентрация металлотионеинов у пациентов первой группы, кровь которых содержала цинк, медь, свинец, кадмий и марганец в пределах референтных значений, а ртуть в следовых количествах, определена как 14,0±0,9 нг/мл с использованием метода связывания кадмия in vitro, а с помощью иммуноферментного анализа у этих же больных регистрировали 10,4±1,1 нг/мл. Уровень металлотионеинов в крови пациентов с повышенной концентрацией марганца и ртути достоверно выше, чем в первой группе при обоих методах определения. Полученные данные могут служить основой дальнейшего мониторинга металлотионеинов в крови людей как одного из биомаркеров воздействия тяжелых металлов.

Ключевые слова: *металлотионеины, плазма крови, метод определения, ртуть, марганец.*

Введение. Металлотионеины (МТ) являются предметом пристального экспериментального изучения в связи с их способностью поддерживать гомеостаз ряда эссенциальных металлов и участвовать в детоксикации так называемых тяжелых металлов. Металлотионеины задействованы и в удалении свободных радикалов, в развитии и функционировании иммунной системы и нейронов мозга, в воспалительных процессах желудочно-кишечного тракта. Несмотря на устоявшиеся представления о подобных функциях металлотионеинов и большое количество экспериментальных результатов, количественные данные о содержании металлотионеинов в биожидкостях человека немногочисленны и противоречивы.

Однако анализ уже имеющихся сведений о роли МТ и на современном этапе исследований позволяет полагать, что повышенное содержание МТ может быть достаточно информативным дополнительным тестом или биомаркером воздействия токсичных металлов (кадмий, ртуть, свинец) при диагностике металлотоксикозов [1–3].

Считают, что ряд патологий, связанных с эффектами таких металлов, могут быть опосредованы МТ, а именно: итай-итай, диабет 2-го типа, болезнь Вильсона, болезнь Менкеса, нейродегенеративные процессы и даже болезнь Альцгеймера [4–7]. Изучение индукции синтеза МТ в лимфоцитах свидетельствует о низком риске развития тубулярной протеинемии у людей с высокой экспрессией МТ [8–9] и, напротив, при слабой эффективности индуктивного синтеза (или низкого исходного пула МТ) может быть повышена чувствительность даже к низким дозам токсичных металлов [10].

Следует отметить, что практическое использование знаний о концентрации металлотионеинов в биожидкостях организма ограничено тем, что их синтез может быть индуцирован не только указанными металлами, но и стероидными гормонами, ионизирующей радиацией, стрессом и некоторыми другими факторами. Значения концентраций этих белков в крови варьируют у разных групп исследователей и при использовании различных методов от единиц нанограмм до десятков микрограмм в миллилитре [1]. Весьма актуальным поэтому представляется вопрос о стандартизации методов определения металлотионеинов, что позволило бы более объективно судить об их вкладе в развитие адаптационных и патологических процессов в человеческом организме. Не претендуя на решение такого вопроса, в работе была поставлена задача сравнительной оценки концентрации металлотионеинов в плазме крови пациентов консультативно-диагностической поликлиники в рамках двух существующих методов определения: с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) и по уровню связывания кадмия in vitro.

Материалы и методы исследования. Проведено определение металлотионеинов в образцах плазмы крови пациентов (29 человек) обоего пола, в возрасте от 28 до 64 лет. В крови всех пациентов концентрации цинка, меди, кадмия и свинца регистрировались в пределах референтных значений. В зависимости от содержания в крови ртути и марганца пациенты были ранжированы на 2 группы. В первой группе пациентов (21 человек) уровни марганца не превышали референтных значений для профессионально незанятого населения, а ртуть обнаруживалась в следовых количествах – менее 0,5 мкг/л. Данную группу пациентов составили жители разных регионов России, которые на момент сдачи крови не имели воспалительных и обострения хронических заболеваний. Во вторую группу были отнесены 8 пациентов – жителей Санкт-Петербурга, в крови которых был обнаружен марганец в концентрации от 10 до 30 мкг/л и ртуть в концентрации 2,2–7,4 мкг/л.

Концентрацию марганца оценивали с помощью атомно-абсорбционного метода [11], ртути – «методом холодного пара» на анализаторе ртути «Юлия-2» в соответствии с Методическими рекомендациями № 4096-86, утвержденными Минздравом РФ 14.04.86, МУК 4.1.1470-03 и ГОСТ 26927- 86.

Металлотионеины плазмы крови определяли двумя способами: иммуноферментным методом и по уровню связывания кадмия in vitro с использованием атомно-абсорбционной спектрометрии. Иммуноферментный анализ осуществляли с помощью набора для количественного определения тотальных металлотионеинов в крови человека производства фирмы Cusabio (Китай), содержащего планшеты с иммобилизированными антителами. Измерения проводили на приборе Microelisa Autoreader MR580.

В качестве второго способа определения металлотионеинов был использован метод вытеснения избытком кадмия из низкомолекулярных белков плазмы связанных с металлотионеинами эссенциальных металлов, таких как цинк и медь [12]. После удаления избыточного кадмия из фракции низкомолекулярных белков плазмы [13] концентрацию связанного кадмия измеряли методом атомно-абсорбционной спектрометрии с электротермической атомизацией [14]. На основе определенной таким образом концентрации кадмия рассчитывали содержание металлотионеинов, принимая стехиометрическое соотношение кадмий/металлотионеин равным 7, а среднюю молекулярную массу металлотионеинов, характерных для плазмы крови (MTI и MTII), равной 6,5 кДа.

Статистическую обработку данных проводили с помощью электронного пакета анализа Excel. При сравнении данных, полученных для 1-й и 2-й группы пациентов, использовали t-критерий Стъюдента. При статистической обработке сравнительных результатов определения, полученных двумя разными методами внутри групп пациентов, применяли непараметрический Т-критерий Вилкоксона, предназначенный для выявления различий в связанных выборках.

Результаты и обсуждение. Данные отражают уровни металлотионеинов у двух групп пациентов. Результаты оценки концентрации металлотионеинов в первой группе пациентов, плазма которых не содержала повышенных концентраций цинка, меди, марганца, свинца, ртути и кадмия, приведены в таблице 1. Значения концентрации металлотионеинов, определенные методом ИФА, не идентичны и по Т-критерию Вилкоксона достоверно ниже, чем полученные по связыванию кадмия. Диапазон концентраций металлотионеинов, определяемых по насыщению кадмием, колеблется от 6,2 нг/мл до 22 нг/мл, а по резуль-

Елаева Наталия Львовна (Elaeva Natalia Lvovna) старший научный сотрудник, кандидат биологических наук ФГБУН «Институт токсикологии ФМБА России», nataliaelaeva@yandex.ru
Иваненко Анатолий Александрович (Ivanenko Anatoly Aleksandrovich), старший научный сотрудник, кандидат химических наук, ФГБУН «Институт токсикологии ФМБА России» institute@toxicology.ru
Малов Александр Михайлович Malov (Aleksandr Mikhailovich), старший научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУН «Институт токсикологии ФМБА России», institute@toxicology.ru
Кашуро Вадим (Kashuro Vadim Dmitrievich), заведующий лабораторией, доктор медицинских наук, ФГБУН «Институт токсикологии ФМБА России»,
institute@toxicology.ru
Велихова Варвара Дмитриевна (Velikova Varvara Dmitrievna), канд. мед. наук, главный врач консультативно-диагностической поликлиники, ФГБУН «Институт токсикологии ФМБА России», institute@toxicology.ru
Соколян Нина Агвановна (Sokolan Nina Agvanovna), кандидат биологических наук, заведующая клинико-диагностической лабораторией ФГБУ «Санкт-Петербургский Научно-исследовательский психоневрологический институт им. В.М. Бехтерева»

татам ИФА от 2,5 нг/мл до 25 нг/мл. Эти данные находятся в области значений концентраций, приводимых для чувствительных методов.

В литературе можно обнаружить сведения о том, что металлотионеины участвуют и в связывании марганца в растительных и животных тканях [15]. В экспериментальных исследованиях отмечено, что снижение концентраций отдельных металлов в крови при их сочетанном поступлении в организм может не сопровождаться снижением токсических эффектов.

Этот факт представляется контраргументом для использования уровней концентраций тяжелых металлов в качестве единственных биомаркеров металлотоксикозов. В связи с этим вопросом в работе было проведено определение металлотионеинов у тех пациентов, в крови которых определялись одновременно повышенные концентрации марганца и концентрации ртути, превышающие следовой уровень. Для второй группы пациентов, как и для первой, результаты определения концентрации металлотионеинов в плазме крови, полученные методом ИФА, по Т-критерию Вилкоксона достоверно ниже.

Как видно из таблицы 2, у второй группы пациентов, в крови которых был обнаружен марганец в концентрации от 10 до 30 мкг/л и ртуть в концентрации 2,2–7,4 мкг/л, оба метода определения металлотионеинов позволили зарегистрировать достоверно более высокие значения концентраций этих белков в плазме крови, чем для первой.

Как видно из таблицы 2, у второй группы пациентов, в крови которых был обнаружен марганец в концентрации от 10 до 30 мкг/л и ртуть в концентрации 2,2–7,4 мкг/л, оба метода определения металлотионеинов позволили зарегистрировать достоверно более высокие значения концентраций этих белков в плазме крови, чем для первой.

Диапазон концентраций металлотионеинов в плазме крови во второй группе значительно шире, чем в первой, и колеблется от 34 нг/мл до 99 нг/мл по связыванию кадмия, а по результатам ИФА от 25 нг/мл до 78 нг/мл.

Заключение. Несмотря на достоверные различия концентраций металлотионеинов, полученных двумя методами, очевидно, что сравнительный анализ, проведенный с их использованием, позволяет выявить резкие различия в первой и второй группах пациентов. Следует отметить возможность использования обоих методов оценки концентрации металлотионеинов для установления лабораторной нормы отдельно в рамках каждого из указанных методов.

Полученные результаты свидетельствуют о значительных отличиях уровней металлотионеинов в плазме крови лиц с повышенным содержанием токсичных металлов (марганец, ртуть) и пациентов без выраженных отклонений по концентрации эссенциальных и токсичных металлов, что может служить основой дальнейшего мониторинга металлотионеинов в крови людей как одного из биомаркеров воздействия тяжелых металлов.

Таблица 1

Концентрация металлотионеинов (нг/мл) в плазме крови первой группы пациентов, определенная с помощью иммуноферментного анализа и по связыванию кадмия

Пациент	Пол	Возраст, годы	Метод определения МТ	
			ИФА	по кадмию
А.Н.	муж.	54	11,8	15,4
Л.П.	жен.	51	10,5	16,1
Ю.И.	муж.	42	6,2	11
Е.Г.	муж.	49	16,6	17,9
Л.П.	муж.	49	10,2	15,3
Л.Г.	жен.	43	4,7	7,6
М.В.	жен.	38	9,6	10,1
В.И.	муж.	57	10,0	17,5
С.Н.	муж.	47	11,8	18
Т.П.	жен.	52	7,1	12,1
Н.Ю.	жен.	33	9,5	14,5
В.С.	муж.	64	25,6	22
А.К.	муж.	46	19,6	21
П.А.	муж.	21	10,0	12,2
А.В.	жен.	44	12,5	18,3
В.В.	муж.	61	11,5	16,5
М.В.	жен.	38	4,3	6,2
Н.И.	жен.	36	9,5	13,5
В.А.	муж.	59	6,5	11,2
К.В.	муж.	28	2,5	6,8
Ю.Н.	муж.	42	9,5	11,.7
Среднее M±m			10,4±1,1	14,0±0,9

Примечание. Разница между концентрациями МТ, определенными двумя методами, достоверна по Т-критерию Вилкоксона ($p < 0,01$).

Таблица 2

Концентрация металлотионеинов (нг/мл) в плазме крови пациентов с повышенным содержанием марганца, определенная с помощью иммуноферментного анализа и по связыванию кадмия

Пациент	Пол	Возраст, годы	Марганец, мкг/мл	Ртуть, мкг/мл	Метод определения	
					ИФА	по кадмию
Н.И.	муж.	52	30	3,7	34	45,6
В.А.	муж.	57	25	2,8	38	49
А.А.	муж.	62	27	2,2	25	34
Т.А.	жен.	62	11	3,4	49	58,2
А.К.	жен.	61	20	2,5	31	46,7
О.А.	жен.	57	12	4,5	59	76,6
В.А.	жен.	54	8	7,4	28	37,3
И.Б.	жен.	36	20	4,3	78	99
M±m					42,7±16,5	55,8±7,2*

Примечания. Разница между концентрациями МТ, определенными двумя методами, достоверна по Т-критерию Вилкоксона ($p < 0,01$); * – различия концентраций достоверны ($p < 0,05$) по сравнению с определенными соответственными методами для первой группы пациентов (см. табл. 1).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Nordberg M., Nordberg G.*//Metallothioneins: Historical Development and Overview. – 2009. – № 5. – P. 1–29.
2. *Шафран Л.М., Пыхтеева Е.Г., Большой Д.В.* Роль металлотионеина в развитии токсических нефропатий // Актуальные проблемы транспортной медицины. – 2006. – № 2(4). – С. 76–80.
3. *Пыхтеева Е.Г.* Металлотионеин: Биологические функции. Практическое применение металлотионеина и его диагностическое значение // Актуальные проблемы транспортной медицины. – 2010. –
№ 2 (20). – С. 76–80.
4. *Nordberg G.F., Jin T., Leffler P., Svensson M., Zhou T. and*
Nordberg M. Metallothioneins and diseases with special reference to cadmium poisoning //Analysis. – 2000. – Vol. 28. – P. 396–400.
5. *Suzuki K.T.* Disordered copper metabolism in LEC rats, an animal model of Wilson disease: roles of metallotionein // Res. Comm. Mol. Pathol. Pharmacol. – 1995. – Vol. 89. – P. 221–240.
6. *Jin T., Nordberg G.F., Sehlin O., Leffler P. and Wu J.* The susceptibility of spontaneously diabetic mice to cadmium-metallothionein nephrotoxicity // Toxicology. – 1994. – Vol. 89. – P. 81–90.
7. *Erickson J.G., Hollopeter G., Thomas S.A., Froelick G.J. and Palmiter R.D.* Disruption of the metallothionein-III gene in mice: analysis of brain zinc, behavior and neuron vulnerability to metals, aging, and seizures //J. Neurosci. R. D. 1997. –Vol. 17. – P. 1271–1281.
8. *Ganguly S., Taioli E., Baranski B., Cohen B., Toniolo P. and Garte S.J.* Human metallothionein gene expression determined by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction as a biomarker of cadmium exposure // Cancer Epidemiol. – 1996. – № 5(4). – P. 297–301.
9. *Lu J., Jin T., Nordberg G. and Nordberg M.* Metallothionein gene expression in peripheral lymphocytes from cadmium-exposed workers // Cell Stress and Chaperones. – 2001. – № 6. – P. 97–104.
10. *Nordberg G., Jin Taiyi, Wu X., Lu J., Chen L., Lei L. ,Hong F., Nordberg M.* Prevalence of kidney dysfunction in humans. – Relationship to cadmium dose, metallothionein. Immunological and metabolic factors //
Biochimie. – 2009. – Vol. 91. – P. 1282–1285.
11. Лабораторная диагностика субхронических интоксикаций соединениями свинца, меди, цинка и марганца атомно-абсорбционным методом. Пособие для врачей-лаборантов. СПб., 2001.
12. *Dieter H.H., Muller J., Abel I., Summer K.H.* Metallothionein-determination in biological materials // EXS. – 1987. – Vol. 52. – P. 351–358.
13. *Шафран Л.М., Большой Д.В., Пыхтеева Е.Г.*, Тимофеева *С.В.* Роль металлотионеинов в биомониторинге загрязнения окружающей среды тяжелыми металлами // Гигиена населенных мест. – 2000. – Вып. 37. – С. 190–193.
14. Иваненко *А.А., Ганеева А.А., Иваненко Н.Б., Носова Е.Б., Молодкина Е.В.* Прямое определение кадмия в крови и плазме крови человека методом атомной абсорбции с электротермической атомизацией: Тез. докл. на II Всероссийской конференции «Аналитические приборы», СПб. – 2005. – С. 245–246.
15. *Южаков В.В., Ротт Г.М., Неборак Ю.Т., Новикова И.С.* Поликлональные антитела к металлотионеинам // Бюл. экспер. биол. и мед. –1998. – № 6. –
С. 709–712.

*N.L. Elaeva, A.A. Ivanenko, V.D. Velikova, W.A. Kashuro, A.M. Malov, N.A. Sokolan**

Comparative analysis of metallothioneins concentrations in blood plasma of people, using two different methods.

FSBSI «Institute of Toxicology» FMBA of Russia,129019, Saint-Petersburg, Russian Federation
* FSBI «St. Petersburg Research Institute of Neuropsychiatric im.V.M. Behtereva»129019, Saint-Petersburg, Russian Federation

Concentration of metallotioneins (MT) was determined as 14.0±0.9 ng/ml using the method of binding cadmium in a group of people in whose blood plasma the content of zinc, copper, lead, manganese, cadmium did not exceed reference values and mercury was in trace amounts. Using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), the content of MT in the same group of patients was determined as 10.4±1.1 ng/ml. The level of metallotioneins (MT) in patients with elevated concentrations of manganese and mercury in blood was authentically higher which was proved by both methods of analysis. Results obtained may serve as a basis for further monitoring of MT in the blood of people as one of biomarkers of exposure to heavy metals.

Key words: *metallotioneins, the blood plasma, method of determination, mercury, manganese.*

Материал поступил в редакцию 18.12.2013 г.

УДК 57.017.3 : 615.917

Антимутагенные эффекты мелатонина у крыс, отравленных циклофосфамидом

Л.В. Пикалова[1], М.Б. Иванов[2], В.А. Горбунов[1]

[1]ФГКВОУ ВПО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» МО РФ, 194044, г. Санкт-Петербург;
[2]ФГБУН «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства», 192019, г. Санкт-Петербург

Исследовано влияние синтетического аналога эпифизарного гормона мелатонина в дозах 5–50 мг/кг на частоту встречаемости хромосомных аберраций в клетках костного мозга крыс, отравленных циклофосфамидом в дозе 200 мг/кг. Экспериментально показано, что однократное профилактическое введение мелатонина в дозе 50 мг/кг за 30 мин до циклофосфамида достоверно снижает количество хромосомных аберраций в активно пролиферирующих клетках с 9,8±1,2% до 6,7±1,0%. В качестве возможных механизмов цитопротективного действия мелатонина рассматривается его влияние на антиоксидантную активность клеток и тканей, а также на пролиферативную и функциональную клеточную активность. Так, показано, что мелатонин снижает проявление оксидативного стресса, вызванного циклофосфамидом, а также нивелирует торможение миграционной активности лейкоцитов периферической крови человека и пролиферативной активности клеток селезенки у крыс.

Ключевые слова: *хромосомные аберрации; мелатонин; циклофосфамид; оксидативный стресс; пролиферативная активность*

Введение. Молекула ДНК – наиболее важная биологическая молекула, повреждение которой при воздействии цитотоксикантов может иметь значимые последствия для организма. В связи с этим одной из проблем современной токсикологии и медицинской защиты является поиск веществ, обладающих способностью защищать генетический аппарат от химически индуцированных повреждений или ускорять репаративные процессы. Одним из таких соединений может стать мелатонин (и/или его синтетические аналоги), который, согласно данным литературы, может активно влиять на мутагенез [1, 2, 3, 4].

В нашем исследовании проведена оценка антимутагенного действия синтетического аналога гипофизарного гормона – мелатонина – на кластогенные эффекты циклофосфамида в миелокариоцитах костного мозга крыс и уточнены возможные механизмы генопротекции.

Материалы и методы исследования. Анализ частоты хромосомных аберраций в миелокариоцитах костного мозга и биохимические исследования выполнены на 310 белых беспородных трехмесячных крысах-самцах массой 180–270 г. Для изучения влияния мелатонина и циклофосфамида на рост клеток в культуре ткани использовали 800 фрагментов селезенки трехмесячных крыс-самцов линии Вистар. Оценка функциональной клеточной активности выполнена на образцах периферической венозной крови 55 мужчин.

В качестве исследуемых веществ использовали мелатонин (НПЦ «Фармзащита ФМБА России») и циклофосфамид (эндоксан) фирмы Baxter (Германия).

В исследованиях *in vivo* препараты вводили внутрибрюшинно: циклофосфамид в дозе 200 мг/кг, мелатонин – в дозах 5, 25 и 50 мг/кг. Животным контрольной группы вводили растворитель – физиологический раствор. В экспериментах *in vitro* препараты добавляли в культуральную среду: циклофосфамид в концентрациях 1,0 мкг/мл, мелатонин – 0,01 нг/мл – 1 мкг/мл. Выбор доз мелатонина осуществляли исходя из рекомендаций, приведенных в литературных источниках [2, 5].

Выделение клеток костного мозга и приготовление препаратов для цитогенетического анализа проводили в соответствии с методическими рекомендациями [6]. Цитогенетический анализ осуществляли по стандартной методике [7], учитывая клетки с одиночными и парными фрагментами хромосом, дицентрическими хромосомами, транслокациями, а также клетки с двумя и более наборами хромосом. Для каждого животного анализировали по 100 метафазных пластинок. Концентрацию малонового диальдегида (МДА) определяли по методу M. Uchiyama [8], а концентрацию продуктов рассчитывали по методике В.Б. Гаврилова [9]. Определение концентрации диеновых конъюгат (ДК) в гомогенатах тканей и гемолизате эритроцитов осуществляли по методике И.Д. Стальной [10]. Активность каталазы определяли методом М.А. Королюка [11]. Определение активности супероксиддисмутазы (СОД) проводили по рекомендациям В.А. Костюк и соавт. [12]. Активность глутатионпероксидазы (ГП) определяли по методу А.Р. Гавриловой [13] с использованием в качестве субстрата гидроперекиси трет-бутила (ГПТБ).

Органотипическое культивирование тканей осуществляли в стерильных условиях [14]. Оценку миграционной активности лейкоцитов проводили в плоскопараллельных капиллярах по стандартной методике [15].

Полученные результаты обрабатывали статистически с помощью t-критерия Стьюдента. Вероятность ошибки $p<0,05$ считали достаточной для вывода о статистической значимости различий полученных данных.

Результаты и обсуждение. Проведенные исследования показали, что циклофосфамид в дозе 200 мг/кг вызывает выраженное повреждение генетического аппарата активно пролиферирующих клеток костного мозга крыс. Так, если у интактных животных количество клеток с хромосомными аберрациями составляло в среднем 1,5%, то через 24 ч после введения циклофосфамида – порядка 10%. При этом наиболее часто встречались такие нестабильные хромосомные аберрации, как парные фрагменты (в 36 клетках с аберрациями), реже – одиночные фрагменты и полиплоидные клетки (в 8 клетках). В единичных случаях (2–3 клетки) отмечались дицентрические хромосомы и транслокации (табл. 1).

Мелатонин в дозах 5 и 25 мг/кг, введенный за 30 мин до циклофосфамида, не способствовал снижению частоты аберрантных клеток. Однако отмечалось уменьшение числа одиночных фрагментов, а также имелась тенденция к снижению парных фрагментов (табл. 1).

Наиболее эффективным защитным действием на генетический аппарат клетки мелатонин обладал в дозе 50 мг/кг. Из данных, представленных в табл. 1, следует, что применение мелатонина приводило не только к снижению частоты хромосомных аберраций с 9,8±1,2 до 6,7±1,0%, но и к уменьшению числа аберраций различных типов (одиночных фрагментов – в 1,6 раза, парных фрагментов – в 1,5 раза, полиплоидных клеток – в 2,5 раза).

Таким образом, мелатонин при профилактическом введении оказывал защитное действие на хромосомный аппарат активно пролиферирующих клеток костного мозга крыс, отравленных циклофосфамидом, что, очевидно, может быть связано с увеличением резистентности генетического аппарата данного типа клеток. Механизм этого эффекта окончательно не установлен. В настоящей работе рассмотрены два аспекта этой проблемы – действие гормона на проявления оксидативного стресса, а также способность мелатонина влиять на функциональную и пролиферативную активность лимфоидных клеток и лейкоцитов периферической крови.

Данные, свидетельствующие о развитии у экспериментальных животных оксидативного стресса, вызванного воздействием циклофосфамида в дозе 200 мг/кг, представлены в табл. 2, из которой видно, что после введения крысам циклофосфамида в печени животных отмечалось увеличение

Пикалова Лидия Васильевна (Pikalova Lidiya Vasil'evna), младший научный сотрудник, ФГКВОУ ВПО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» МО РФ pikalova_lidiya@mail.ru
Иванов Максим Борисович (Ivanov Maxim Borisovich), заместитель директора, ФГБУН «Институт токсикологии Федерального медико-биодогического агентства», m.b.ivanov@toxicology.ru
Горбунов Владимир Акимович (Gorbunov Vladimir Akimovich), врач анестезиолог-реаниматолог клиники военно-полевой терапии ФГКВОУ ВПО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» МО РФ, ra1acq@mail.ru

количества малонового диальдегида (МДА) более чем в 3 раза по сравнению с биоконтролем, а также повышение активности супероксиддисмутазы (СОД). В эритроцитах циклофосфамид способствовал увеличению содержания диеновых конъюгат (ДК).

Мелатонин, введенный животным за 30 мин до циклофосфамида, способствовал снижению количества ДК в печени на 15% по сравнению с контролем, повышению активности каталазы и глутатионпероксидазы (ГП), а также нормализации активности СОД.

В эритроцитах крыс, отравленных циклофосфамидом, под влиянием мелатонина существенно (на 30–40%) снижалось содержание таких продуктов перекисного окисления липидов, как МДА и ДК. Также отмечалось увеличение активности СОД и каталазы в 1,1–1,2 раза (табл. 2).

Таким образом, представленные данные убедительно показывают, что в генопротективной дозе мелатонин обладает и антиоксидантным действием. Возможно, указанный эффект препарата связан с его способностью улавливать свободные радикалы (в частности, ·OH) и образовывать менее токсичные соединения [16, 17].

С целью расширения представления о возможных механизмах формирования возможных антимутагенных эффектов мелатонина было проведено исследование его влияния на пролиферативную активность спленоцитов при воздействии циклофосфамида и на миграционную активность лейкоцитов периферической крови.

Установлено, что циклофосфамид в концентрации 1 мкг/мл вызывал достоверное уменьшение зоны роста эксплантатов селезенки. При этом мелатонин в концентрациях 0,05–100 нг/мл предотвращал индуцированную цитостатиком задержку роста культуральных клеток рост эксплантатов селезенки, а в концентрации 100,0 нг/мл не только нормализовал вызванные циклофосфамидом нарушения клеточной пролиферации, но и способствовал существенному увеличению зоны роста эксплантатов (рис. 1).

В следующей серии экспериментов исследовали влияние мелатонина на миграционную активность лейкоцитов периферической крови человека.

Установлено, что циклофосфамид в концентрации 1 мкг/мл вызывал достоверное уменьшение индекса миграционной активности лейкоцитов периферической крови. На этом фоне мелатонин, начиная с концентрации 0,1 нг/мл и выше, вызывал увеличение индекса миграционной активности лейкоцитов. Максимальное значение миграционной активности зафиксировано при добавлении мелатонина в концентрации 1,0 нг/мл и составило 108,9±2,1% (рис. 2).

Таким образом, в опытах *in vitro* установлено, что мелатонин стимулировал пролиферацию клеток селезенки, подавленную циклофосфамидом, а также нивелировал торможение миграционной активности лейкоцитов периферической крови человека.

Проведенные исследования убедительно показывают, что мелатонин при однократном профилактическом применении обладает антимутагенными свойствами при кластогенных воздействиях, усиливая антиоксидантную, пролиферативную и миграционную активность клеток.

Заключение. Хотя полученные данные не дают полного ответа на вопросы о механизмах генопротективного действия мелатонина, они свидетельствуют о перспективности использования синтетического аналога эпифизарного гормона мелатонина для профилактики развития неблагоприятных цитогенетических последствий воздействия на организм факторов химической природы.

Таблица 1

Влияние профилактического введения мелатонина на частоту возникновения и типы хромосомных аберраций, индуцированных циклофосфамидом (200,0 мг/кг), в клетках костного мозга крыс (M±m, n=30)

Показатель	Группы опытов			
	циклофосфамид (контроль)	Мелатонин		
		5 мг/кг	25 мг/кг	50 мг/кг
Частота аберрантных клеток, %	9,8±1,2	9,2±1,1	9,3±1,4	6,7±1,0*
Одиночные фрагменты	8,0±1,2	3,0±0,9*	4,0±0,9*	5,0±1,0
Парные фрагменты	36,0±2,0	25,0±2,1*	30,0±2,2	29,0±2,4*
Дицентрические хромосомы	2,0±0,8	2,0±0,5	2,0±0,6	1,0±0,4
Транслокации	3,0±0,7	2,0±0,5	2,0±0,6	2,0±0,6
Полиплоидные клетки	8,0±1,2	6,0±1,3	6,0±1,3	3,0±0,7*

* Отличие (по t-критерию Стьюдента) от группы «Контроль» достоверно, $p<0,05$.

Таблица 2

Влияние мелатонина в дозе 50 мг/кг на показатели продуктов перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты в тканях печени и эритроцитах крыс при остром отравлении циклофосфамидом (200 мг/кг) (M±m, n=50)

	Показатель	Группа исследования		
		Биоконтроль	Циклофосфамид (контроль)	Мелатонин
Печень	МДА, нмоль/г ткани	108,09±17,91	362,97±91,57*	382,91±151,45*
	ДК, нмоль/г ткани	39,72±2,193	43,43±2,74	36,75±3,50^
	СОД, УЕ/мг белка ткани	5230,3±432,8	6526,8±316,7*	5547,9±358,7^
	Каталаза, моль/мин г белка ткани	47,24±1,67	43,12±3,9	50,92±2,53^
	ГП, нмоль/мин г белка ткани	0,489±0,053	0,558±0,086	0,78±0,126*^
Эритроциты	МДА, нмоль/г Hb	3,58±0,18	3,23±0,33	2,02±0,17*^
	ДК, нмоль/г Hb	290,66±6,52	326,94±16,14*	222,59±19,03^
	СОД, УЕ/г Hb	3786,51±98,98	3674,42±231,89	4371,69±358,82*^
	Каталаза, моль/мин г Hb	78,87±5,47	74,93±3,94	82,18±2,4^
	ГП, мкмоль/мин г Hb	0,7±0,02	1,2±0,06	1,1±0,02

* Отличие (по t-критерию Стьюдента) от группы «Биоконтроль» достоверно, p<0,05. ^ Отличие (по t-критерию Стьюдента) от группы «Контроль (циклофосфамид)», p<0,05.

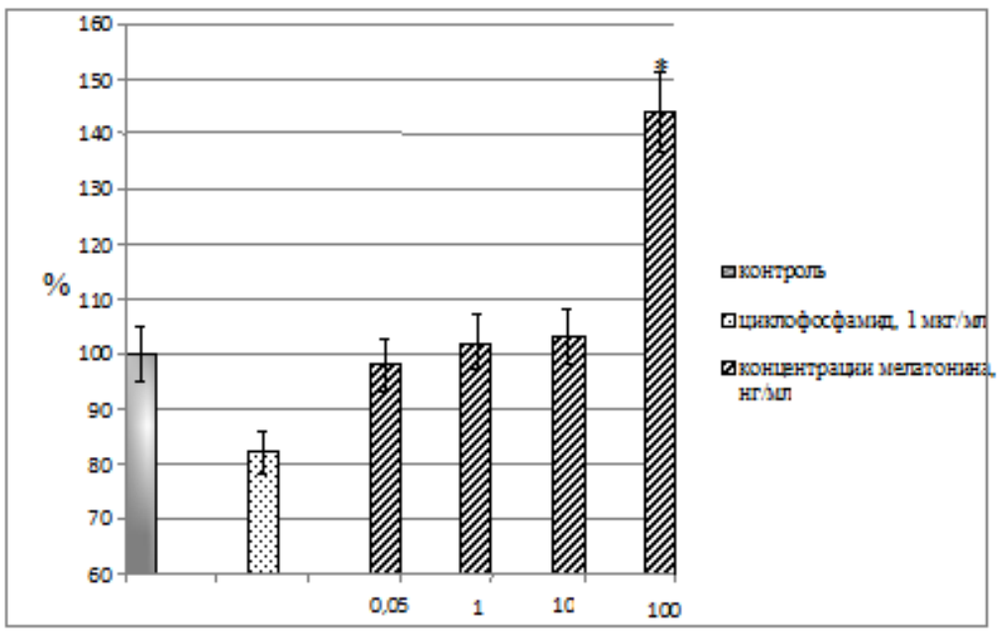


Рис. 1. Влияние мелатонина (нг/мл) на выраженность ингибирования роста эксплантатов селезенки крыс, индуцированных циклофосфамидом (1 мкг/мл). По оси абсцисс – концентрации мелатонина. По оси ординат – изменения уровня миграционной активности лейкоцитов (% от группы «Контроль»). *Отличие (по t-критерию Стьюдента) от группы «Контроль» достоверно, $p<0,05$.

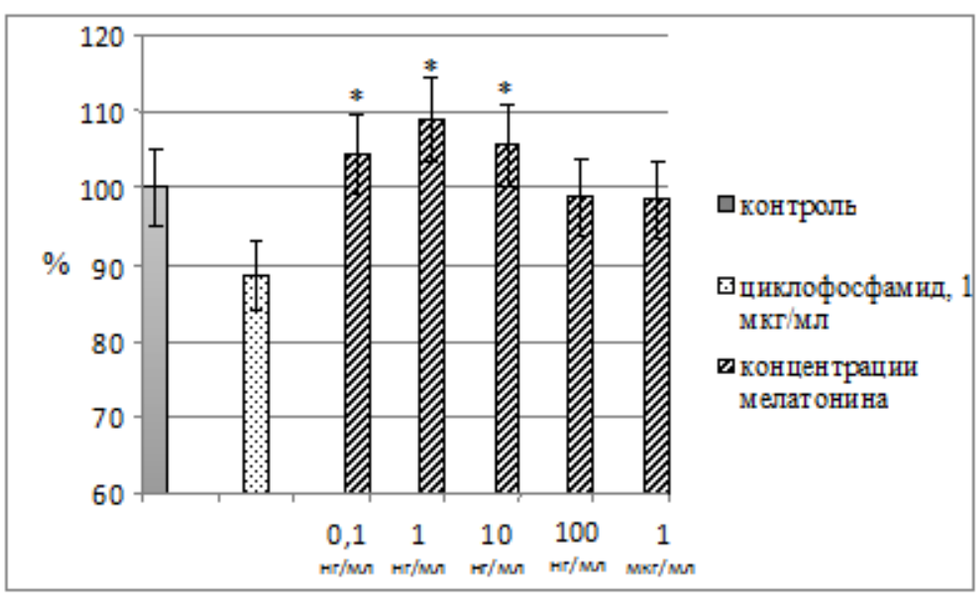


Рис. 2. Влияние мелатонина на миграционную активность лейкоцитов периферической крови человека в присутствии циклофосфамида в концентрации 1 мкг/мл. По оси абсцисс – концентрации мелатонина. По оси ординат – изменения площади зоны роста эксплантата (% от группы «Контроль»). *Отличие (по t-критерию Стьюдента) от группы «Контроль» достоверно, $p<0,05$.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Пикалова Л.В., Легеза В.И., Иванов М.Б. Жаковко Е.Б.* Экспериментальное исследование цитопротективного действия мелатонина при радиационном воздействии. Бюлл. эксп. биол. и мед. 2011; 152 (7): 83-6.
2. *Vijayalaxmi, Retter R.J., Tan D-X., Herman T.S., Thomas C.R.* Melatonin as a radioprotective agent: a review. Intern. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 2004; 59 (3): 639-53.
3. *Reiter R.J., Korkmaz A., Ma S., Rosales-Corral S., Tan D-X.* Melatonin protection from chronic, low-level ionizing radiation. Mutat. Res. 2012; 1: 7-14.
4. *Sarabia L., Maurer I., Bustos-Obergon E.* Melatonin prevents damage elicited by the organophosphorous pesticide diazinin on mouse sperm DNA. Ecotoxicol. Environ. Saf. 2009; 72 (2): 663-8.
5. *Cuzzocrea S., Tan D.X., Costantino G., et al.* The protective role of endogenous melatonin in carageenan-induced pleurisy in the rat. FASEB J. 1999; 13: 1930-38.
6. *Preston R.J., Dean B.J., Galloway S., Holden H., McFee A.F., Shelby M.* Mammalian in vivo cytogenetic assays. Analysis of chromosome aberration in bone marrow cells. Mutat. Res. 1987; 189 (2): 157-65.
7. *Scott D., Danford N.D., Dean B.J, Kirkland D.J.* Chromosome aberration assay in mammalian cells in vitro. Report of the UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Ed. Dean B.J. United Kingdom Environmental Mutagen Society, Swnsea, 1983: 43-64.
8. *Michara M., Uchiyama M.* Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. Anal. Biochem. 1978; 86 (1): 271-78.
9. *Гаврилов В.Б., Гаврилова А.Р., Мажуль Л.М.* Анализ методов определения продуктов перекисного окисления липидов в сыворотке крови по тесту с тиобарбитуровой кислотой. Вопр. мед. химии. 1987; 33 (1): 118-22.
10. *Стальная И.Д.* Метод определения диеновой конъюгации ненасыщен-ных высших жирных кислот. Современные методы в биохимии. М.; 1977.
11. *Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. и др.* Метод определения активности каталазы. Лаб. дело. 1988; 1: 16-9.
12. *Костюк В.А., Потапович А.И., Ковалева Ж.В.* Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцитина. Вопр. мед. химии. 1990; 36 (2): 88-91.
13. *Гаврилова А.Р., Хмара Н.Ф.* Определение активности глутатионпероксидазы эритроцитов при насыщающих концентрациях субстратов. Лаб. дело. 1986; 12: 721-24.
14. *Чалисова Н.И., Хавинсон В.Х., Пенниайнен В.А., Григорьев Е.И.* Влияние полипептидных фракций тимуса на развитие органотипической культуры вилочковой железы и селезенки крысы. Цитология. 1999; 41 (10): 889-94.
15. *Фримель Г.*, ред. Иммунологические методы. М.: Медицина; 1987.
16. *Galano A.* On the direct scavenging activity of melatonin towards hydroxyl and a series peroxyl radicals. Phys. Chem. Chem. Phys. 2011; 13(15): 7178-88.
17. *Pieri C., Marra M., Moroni F., Recchioni R., Marcheselli F.* Melatonin: a peroxyl radical scavenger more effective than vitamin E. Life Sci. 1994; 55(15): PL271-6.

L.V. Pikalova[1], M.B. Ivanov[2], V.A Gorbunov[1].

Antimutagenic effects of melathonin in rats poisoned with cyclophosphamide

[1]S.M. Kirov Military-Medical Academy, RF Ministry of Defense, 194044, St.Petersburg, Russian Federation
[2]Federal State Budgetary Institution «Research Institute of Toxicology», Federal Medical -Biological Agency, 192019, St.Petersburg, Russian Federation

The impact of the synthetic analogue of melathonin epiphyseal hormone in doses of 5 to 50 mg/kg on the incidence of chromosome aberrations in bone marrow cells of rats poisoned with cyclophosphamide in a dose of 200 mg/kg was investigated. It was experimentally shown that a single prophylactic administration of melathonin 30 minutes before cyclophosphamide uptake authentically lowers the number of aberrations in actively proliferating cells from 9.8±1.2% to 6.7±1.0%. As possible mechanisms of the melathnin cytoprotective action, is considered its influence on antioxidant activity of cells and tissues and on proliferative and functional activity of cells. For example, it was shown that melathonin reduces the manifestation of oxidative stresses caused by cyclophosphamide and also evens retardation of the leukocytes migration activity in human peripheral blood and proliferative activity of lien cells in rats.

Key words: *chromosome aberrations; melathonin; cyclophosphamide; oxidative stress; proliferative activity.*

Материал поступил в редакцию 28.06.2013 г.

УДК 613.6 : 615.9

М.В. Бидевкина

ФБУН «НИИ дезинфектологии Роспотребнадзора», 117246, г. Москва

Прогнозирование гигиенических нормативов в воздухе рабочей зоны химических веществ, обладающих нефротоксическим действием

На основе определения в краткосрочном эксперименте минимально эффективных (пороговых) концентраций различных по химической структуре химических веществ, обладающих нефротоксическим действием, предложен новый метод установления их гигиенических нормативов в воздухе рабочей зоны.

Ключевые слова: *гигиеническое нормирование, биомаркеры нефротоксического действия, минимально эффективная концентрация при кратковременном ингаляционном воздействии.*

Введение. Установление безопасных уровней воздействия химических веществ на организм работающих остается одним из основных направлений профилактической медицины. Поэтому разработка новых методов гигиенического нормирования вредных веществ является актуальной задачей. Одним из перспективных направлений в решении указанной задачи является выявление характера биологического действия веществ на организм при краткосрочном воздействии и прогнозирование на основе установленных величин минимально эффективных концентраций гигиенических нормативов. Данный подход был использован для определения ОБУВ веществ, Lim_{ac} которых установлен по изменению поведенческих реакций или обладающих гепатотоксическим действием [1].

Промышленные яды довольно часто обладают нефротоксическим действием. Так, анализ данных литературы показал, что среди соединений, для которых установлены ПДК и ОБУВ в воздухе рабочей зоны, доля веществ, вызывающих изменение функционального состояния почек на уровне Lim_{ac}, достигает 17%. При этом вещества, вызывающие на уровне Lim_{ac} только изменения функции почек, составляют 2%, а химические соединения, вызывающие параллельно изменения функционального состояния других органов и систем организма, – около 15%.

Целью данной работы являлась разработка метода гигиенического нормирования в воздухе рабочей зоны веществ, оказывающих на уровне Lim_{ac} изменение функционального состояния почек.

Материалы и методы исследования. Проведено определение порогов острого действия по интегральным и специфическим показателям 16 веществ: барбитуровой кислоты (CAS 67-52-7), гидразона (CAS 101783-07-7), динатрия селенита (CAS 10102-18-8), дифенилкарбоната (CAS 102-09-0), дициклогексиловых эфиров адипиновой, глутаровой, янтарной кислот (CAS: 849-99-0, 3960-03-0, 965-40-2), мезо-инозита (CAS 87-89-8), карфедона (CAS 77472-70-9), ментола (CAS 1490-04-6), 2-метоксиэтилацетата (CAS 110-49-6), 2,2,3,3-тетрафторпропилметакрилата (CAS 88508-33-2), продуктов микробиологического синтеза (β-глюканаза, мацеробациллин, препарат Феркон, гидролизат рибонуклеиновой кислоты).

Экспериментальные исследования проведены в соответствии с методическими указаниями [2] на белых крысах популяции Вистар на основании «Правила лабораторной практики» (Приказ Минздравсоцразвития России от 23 августа 2010 г. №708н).

Ингаляционные затравки животных проводили в затравочных камерах объемом 200 л динамическим способом. Продолжительность однократной ингаляционной затравки составляла 4 ч. Кроме того, изучали влияние гидразона на организм крыс при введении в желудок в течение 1 месяца (5 раз в неделю в течение 4 недель) [3].

Для регистрации проявлений интоксикации у лабораторных животных оценивали функциональное состояние нервной (суммационно-пороговый показатель, поведенческие реакции), дыхательной системы (частота дыхания), печени (активность в сыворотке крови аминотрансфераз, щелочной фосфатазы; содержание гиппуровой кислоты в моче). О нефротоксическом действии изученных веществ судили по комплексу показателей, отражающих основные функции почек – экскреторную и гомеостатическую. У подопытных животных регистрировали суточный диурез после водной нагрузки; содержание в моче белка, ионов хлоридов, мочевины и/или креатинина; содержание в сыворотке крови мочевины и/или креатинина, ионов натрия, калия, кальция; стандартный коэффициент очищения мочевины (СКОМ) и/или скорость клубочковой фильтрации (СКФ).

Результаты и обсуждения. Проведенные исследования показали, что все изученные вещества на уровне Lim_{ac} вызывают изменения функционального состояния почек белых крыс. Установленные параметры токсикометрии приведены в таблице.

Как следует из приведенных данных, изученные вещества относятся к разным классам опасности при различных путях поступления в организм. Так, динатрия селенит относится к чрезвычайно опасным веществам при введении в желудок (DL_{50} составляет 8,4 мг/кг) и при ингаляции (ОБУВ – 0,05 мг/м³). 2-метоксиэтиловый эфир уксусной кислоты относится к умеренно опасным веществам при поступлении в организм через желудочно-кишечный тракт и к малоопасным – при ингаляционном пути поступления (ПДК 10 мг/м³, IV класс опасности).

Большинство изученных веществ слабо кумулируют в организме при повторном введении в желудок. К высоко кумулятивным веществам относится селенит натрия (C_{cum} = 1,6), к умеренно кумулятивным – дифенилкарбонат (C_{cum} = 3,5).

Следует подчеркнуть, что нефротоксическое действие гидразона проявлялось и при длительном воздействии в минимально эффективных дозах: при введении в желудок крыс в дозе на уровне Lim_{subch} (25 мг/кг) выявлено увеличение содержания в моче белка, хлоридов и мочевины.

Нарушение функционального состояния почек на уровне Lim_{ac} характеризовалось изменением одного или нескольких регистрируемых показателей. Изменение содержания хлоридов в моче встречалось как в сторону повышения, так и в сторону понижения. При ингаляции крыс аэрозолем барбитуровой кислоты в концентрации 535 ± 40 мг/м³ (Lim_{ac}) наблюдалось повышение содержания хлоридов в моче практически в 2 раза (опыт: 233,3 ± 18,0 мМ/л; контроль: 117,0 ± 10,4 мМ/л; $p < 0,02$). Снижение содержания хлоридов в моче крыс (опыт: 46,8 ± 5,4 мМ/л; контроль: 64,3 ± 7,1 мМ/л; $p < 0,05$) зарегистрировано при воздействии дифенилкарбоната в концентрации 38,2 ± 4,2 мг/м³ (Lim_{ac}); при ингаляции в концентрации, превышающей Lim_{ac} (54,8 ± 6,3 мг/м³), снижение содержания хлоридов было значительнее и составило 50% (опыт: 34,7 ± 9,2 мМ/л; контроль: 68,7 ± 8,3 мМ/л; $p < 0,01$).

Изменения суточного диуреза и СКФ у экспериментальных животных также носили разнонаправленный характер. Так, при ингаляции аэрозолем гидролизата рибонуклеиновой кислоты зарегистрировано повышение СКФ в опытной группе до 197,9 ± 21,7 мкл/мин. (контроль: 123,9 ± 14,6 мкл/мин; $p < 0,05$), а при ингаляции ментола происходило снижение СКФ в два раза (опыт: 58,6 ± 8,6 мкл/мин; контроль: 118,2 ± 11,7мкл/мин; $p < 0,002$).

Наиболее значительное повышение содержания белка в моче зарегистрировано при ингаляции аэрозолями β-глюканазы и мезо-инозита (опыт: 33,3 ± 4,5 мг%; контроль: 20,6 ± 2,3 мг%; $p < 0,05$).

Однако следует отметить, что практически все изученные вещества на уровне Lim_{ac} наряду с изменением функции почек вызывали нарушение функционального состояния нервной, дыхательной системы или печени.

Анализ материалов по обоснованию гигиенических нормативов химических веществ в воздухе рабочей зоны, представленных в подкомиссию «Профессиональные риски и здоровье работающих при воздействии химических факторов» Проблемной комиссии «Научные основы медицины труда» РАМН за период 1990–2010 гг., позволил выявить ряд веществ, Lim_{ac} которых установлен при однократном ингаляционном воздействии, установлены только по изменению функции почек. Указанные вещества (2-аминоэтансульфоновая кислота, бис-β-аминоэтилдисульфид гидрохлорид, калия ацетат, 1-(2-этоксиэтил)-4-этинил-4-оксипиперидин и др.) относятся к разным классам химических соединений, их минимально эффективные уровни воздействия находятся в пределах от 2 до 138 мг/м³, ПДК/ОБУВ – от 0,01 до 5 мг/м³. Большая группа соединений на уровне Lim_{ac} вызывала изменение регистрируемых показателей интоксикации, отражающих как функцию почек, так и других органов и систем. Для оценки нефротоксического действия химических веществ использовались те же показатели, что и в наших исследованиях: диурез, содержание в моче белка, определение в моче и крови мочевины, ионов хлоридов, натрия, калия, кальция, неорганического фосфора, плотность мочи.

На основании экспериментальных и литературных данных построена математическая модель прогнозирования гигиенических нормативов химических веществ с нефротоксическим действием в воздухе рабочей зоны.

Бидевкина Марина Васильевна (Bidevkina Marina Vasilyevna), кандидат медицинских наук, зав. лабораторией токсикологии дезсредств, ФБУН «НИИ дезинфектологии Роспотребнадзора», BidevkinaMV@niid.ru

В результате проведенного математического анализа для расчета ОБУВ рекомендованы следующие формулы:

Для веществ, Lim_{ac} которых установлен по комплексу показателей, характеризующих функцию почек:

lg ОБУВ = 1,18 $lg\ Lim_{ac}$ – 1,78 (мг/м³), (n = 18, r = 0,87, so = 0,37, p < 0,001);

Для веществ, Lim_{ac} которых установлен по изменению функции почек и нервной системы:

lg ОБУВ = 0,80 $lg\ Lim_{ac}$ – 1,20 (мг/м³), (n = 61, r = 0,87, so = 0,38, p < 0,001);

Для веществ, Lim_{ac} которых установлен по изменению функции почек и печени:

lg ОБУВ = 0,87 $lg\ Lim_{ac}$ – 1,27 (мг/м³), (n = 50, r = 0,82, so = 0,44, p < 0,001).

В результате проведенных исследований определен комплекс показателей для оценки функционального состояния почек экспериментальных животных: суточный диурез, содержание в моче белка и ионов хлоридов, содержание мочевины и/или креатинина в моче и сыворотке крови.

Заключение. Разработан метод установления ОБУВ в воздухе рабочей зоны веществ, обладающих нефротоксическим действием. Метод основан на определение минимально эффективных (пороговых) концентраций веществ при однократном ингаляционном воздействии по комплексу показателей, характеризующих функцию почек. ОБУВ вещества вычисляется с помощью предложенных формул, отражающих математическую зависимость между величиной гигиенического норматива и Lim_{ac}.

Для оценки функционального состояния почек рекомендован комплекс адекватных информативных показателей, который позволяет выявить изменения функционального состояния почек крыс на минимально эффективных уровнях воздействия вредных химических веществ.

Предложены математические модели расчета ОБУВ веществ, обладающих нефротоксическим действием.

Таблица

Параметры токсикометрии изученных веществ

№	Название	DL_{50}, мг/кг, мыши	DL_{50}, мг/кг, крысы	Lim_{ac}, мг/м³	ПДК/ ОБУВ, мг/м³
1	Барбитуровая кислота	>7500	13400	535	10
2	Гидразон	4600	>10000	104	2
3	Гидролизат рибонуклеиновой кислоты	>10000	>10000	140	10
4	В-глюканаза	>10000	>10000	85	2
5	Дифенилкарбонат	1880	2400	38,2	0,5
6	Дициклогексиловый эфир адипиновой кислоты	>10000	10500	108	5
7	Дициклогексиловый эфир глутаровой кислоты	15000	17000	170	10
8	Дициклогексиловый эфир янтарной кислоты	14800	12000	163	10
9	Карфедон	6800	-	212	5
10	Мацеробациллин	>10000	>10000	57	2
11	Мезо-инозит	10000	-	200	10
12	Ментол	2750	3300	16,5	1
13	2-Метоксиэтилацетат	3100	2900	678	10
14	Динатрия селенит	8,4	-	3,9	0,05
15	2,2,3,3-тетрафторпропилмет-акрилат	–	1850	1130	10
16	Феркон	>10000	>10000	18,5	2

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Методические указания по установлению ориентировочных безопасных уровней воздействия вредных веществ в воздухе рабочей зоны (№ 4000-85 от 4.11.85). – М., 1985. – С. 6–7.
2. *Бидевкина М.В., Жолдакова З.И., Тульская Е.А., Иванов Н.Г., Голубева М.И. и соавт.* 3[[-4-(Фенилметокси)фенил]гидразон]-пиперидин-2,3-дион. // Токсикологический вестник. №2, 2006. – С. 41–42.
3. 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.

M.V. Bidevkina

Forecasting of hygienic standards for chemicals with nephrotoxic effect in the work zone air

Federal budgetary institution of a science «Scientific Research Disinfectology Institute» (FBIS SRDI),
117246, Moscow, Russian Federation

Based on the short-term test determination of minimal effective (threshold) concentrations of chemicals with different chemical structure having nephrotoxic potency, a new method for determination of their hygienic standards in the work place air was suggested.

Key words: *biomarkers of nephrotoxic potency, hygienic regulation, minimal effective concentration at short-term inhalation exposure.*
Переработанный материал поступил в редакцию 16.07.2013 г.

УДК 543.544.054.9 : 615.07

Определение остаточных количеств имидаклоприда и тиаклоприда в биологических объектах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Т.В. Бойко[1], Л.К. Герунова[1], Т.В. Герунов[1], М.Н. Гонохова[1], Д.С. Гончаров[2], И.С. Погодин[2], Е.А. Лукша[2]

[1]ФГБОУ ВПО «Омский государственный аграрный университет им. П.А. Столыпина», 644008, г. Омск; [2]ФГБОУ ВПО «Омская государственная медицинская академия», 644043, г. Омск

Разработан способ определения остаточных количеств имидаклоприда и тиаклоприда в биологическом материале (кровь, внутренние органы и ткани животных) с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Ключевые слова: *имидаклоприд, тиаклоприд, кровь, внутренние органы и ткани, высокоэффективная жидкостная хроматография.*

Введение. Разработка методов идентификации токсических веществ в объектах окружающей среды является приоритетным направлением профилактической токсикологии. С появлением новых классов пестицидов разрабатываются и методы определения их остаточных количеств в растительном и/или биологическом материале. Следует отметить, что для большинства групп пестицидов разработаны методы их верификации только в растительном материале.

Неоникотиноиды относят к современным группам инсектицидов, широко используемых в современных схемах ротации при интегрированной защите растений и животных [1]. Ассортимент неоникотиноидов представлен более 40 препаратами на основе пяти действующих веществ: имидаклоприда, тиаклоприда, тиаметоксама, клотианидина и ацетамиприда. В ветеринарии для лечения эктопаразитозов мелких домашних животных рекомендованы Адвантейдж (имидаклоприд), Адвантикс (Имидаклоприд + Перметрин) и Адвокат (Имидаклоприд + Моксидектин), для обработки животноводческих помещений – Агита (Тиаметоксам). При нарушении регламентов использования пестицидов возможны отравления ими животных, для диагностики которых необходимы чувствительные и легко воспроизводимые методы определения остаточных количеств в биологических жидкостях, органах и тканях животных.

В настоящее время для аналитического контроля остаточных количеств неоникотиноидных инсектицидов в продуктах питания, объектах сельского хозяйства и окружающей среды используют газовую хроматографию с масс-спектрометрией [2], электрохимические методы [3], иммуноферментный твердофазный анализ [4], метод мицеллярной электрокинетической хроматографии [5]. Стоит отметить, что применение многих из этих методов в ветеринарных лабораториях затруднительно вследствие использования в качестве растворителей токсичных соединений, а также дорогостоящих

Бойко Татьяна Владимировна (Boiko Tatyana Vladimirovna), доцент 1ФГБОУ ВПО «Омский государственный аграрный университет им. П.А. Столыпина», tvboiko@rambler.ru;
Герунова Людмила Карповна (Gerunova Luidmila Karpovna), профессор, ФГБОУ ВПО «Омский государственный аграрный университет им. П.А. Столыпина»,
Герунов Тарас Владимирович (Gerunov Taras Vladimirovich); доцент ФГБОУ ВПО «Омский государственный аграрный университет им. П.А. Столыпина»,
Гонохова Марина Николаевна (Gonohova Marina Nikolaevna); доцент, ФГБОУ ВПО «Омский государственный аграрный университет им. П.А. Столыпина»,
Гончаров Дмитрий Сергеевич (Goncharov Dmitriy Sergeevich); ассистент, ФГБОУ ВПО «Омская государственная медицинская академия»
Погодин Илья Сергеевич (Pogodin Ilia Sergeevich); старший преподаватель, ФГБОУ ВПО «Омская государственная медицинская академия»
Лукша Елена Александровна (Lucsha Elena Alexandrovna), доцент, ФГБОУ ВПО «Омская государственная медицинская академия»

реагентов и приборов. Кроме того, стандартные методики по определению токсикантов в различных субстратах ориентированы на извлечение их остатков из больших навесок, что способствует образованию большого количества соэкстрактивных веществ, мешающих проведению анализа и требующих включения этапа очистки экстракта, что ведет к снижению чувствительности метода и увеличению времени для проведения анализа.

В настоящее время одним из доступных селективных методов физико-химического анализа признан метод высокоэффективной жидкостной хроматографии, который получил наибольшее применение в рутинных исследованиях химико-токсикологических отделов лабораторий [6, 7, 8, 9].

В связи с этим была поставлена *цель* – разработать способ определения имидаклоприда и тиаклоприда в биологическом материале с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Материалы и методы исследования. Для приготовления элюентов и растворов анализируемых соединений использовали: ацетон (о.с.ч., ТУ 6-09-3513-86), ацетонитрил для ВЭЖХ («В-230НМ» или х.ч., ТУ 6-09-3534-87), в качестве поглотителя влаги из экстракционных проб биологического материала использовали натрий сернокислый безводный (ч., ГОСТ 4166-76).

Объектом исследования служили модельные растворы имидаклоприда, полученные из оригинальных пестицидных препаратов Конфидор экстра® (имидаклоприд, 700 г/л) и Калипсо® (тиаклоприд, 480 г/л) компании «Байер КропСайенс» (Германия). Интоксикацию моделировали путем однократного внутрижелудочного введения белым нелинейным крысам массой 150–170 г пестицидов в дозе 100 мг/кг и 30 мг/кг соответственно (1/5 $ЛД_{50}$). Остаточные количества пестицидов определяли в крови, содержимом желудка и кишечника, печени, почках, легких, надпочечниках, лимфатических узлах, мышечной ткани, коже и волосяном покрове животных в разные сроки после интоксикации. Содержание и выведение животных из эксперимента проводили в соответствии с приказом Минздрава России № 267 от 19 июня 2003 г. «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных».

Степень извлечения пестицидов устанавливали методом добавления растворов стандартных образцов к исследуемому биологическому материалу. В качестве стандартов при хроматографировании использовали 0,002%-ные растворы имидаклоприда и тиаклоприда в ацетонитриле.

Анализ исследуемых соединений проводили на жидкостном хроматографе LC-20 Prominence (Shimadzu) с диодно-матричным детектором SPD-M20A с аналитической колонкой, заполненной сорбентом PerfectSil 300 ODS C_{18}, 4,6 х 250 мм с размером частиц 5 мкм. Система подвижных растворителей включала ацетонитрил и воду в соотношении 4:1 [10]. Объем вводимой пробы составлял 20 мкл при скорости расхода подвижной фазы 1 мл/мин.

Результаты и обсуждение. При выборе хроматографических условий исходили из физико-химических свойств неоникотиноидов. Общим в структуре неоникотиноидов является наличие ароматического кольца – малополярной ароматической углеродной и гетероуглеродной основы, несущей более полярные заместители. Такой тип структуры предопределяет использование обращенно-фазового варианта ВЭЖХ [10].

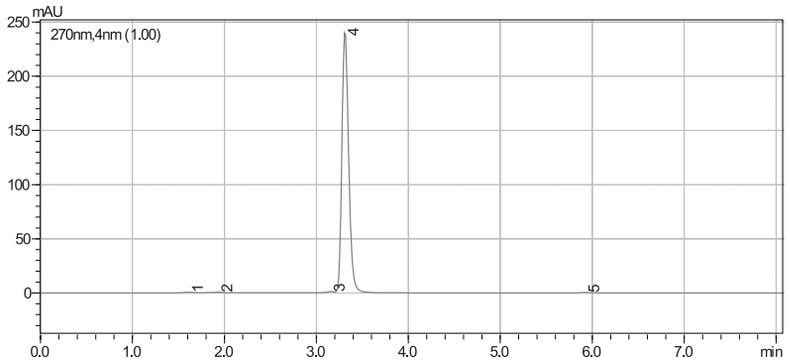


Рис. 1. Имидаклоприд, стандарт 20мкг/мл, скорость потока 1 мл/мин

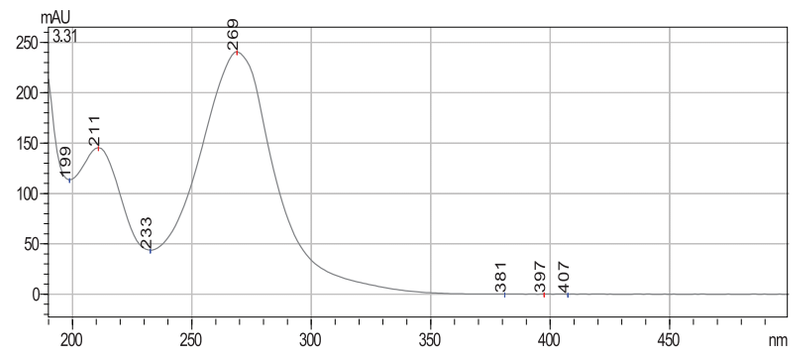


Рис. 2. УФ-спектр имидаклоприда

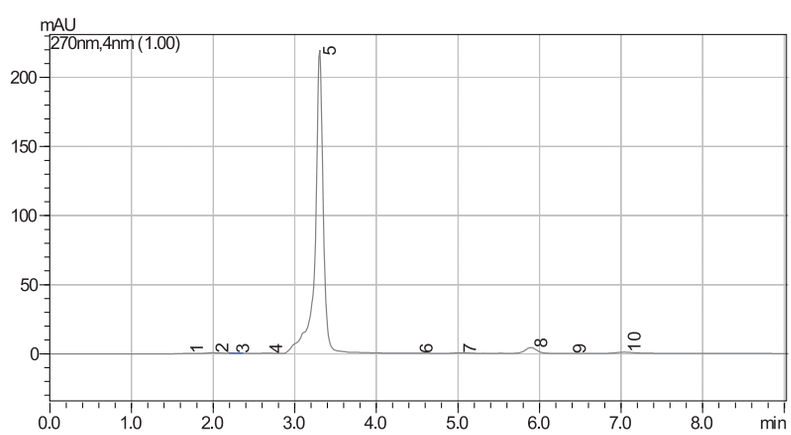


Рис. 3. Имидаклоприд (5) в крови через 4 часа после интоксикации крыс Конфидором экстра в дозе 1000 мг/кг массы, скорость потока 1 мл/мин

Спектры поглощения снимали в автоматическом режиме работы детектора в диапазоне длин волн от 190 до 360 нм. Установлены максимумы светопоглощения пестицидов, хорошо согласующиеся с данными литературы: для имидаклоприда – 270 ± 1 нм, для тиаклоприда – 240 ± 1 нм (рис. 2, 5).

С учетом методик определения имидаклоприда и тиаклоприда в растительном материале предварительно были определены органические растворители для выделения неоникотиноидов из биологического материала: гексан, ацетонитрил, ацетон [7, 8, 9]. Опытным путем была установлена высокая экстракционная способность ацетона, поэтому все последующие эксперименты проводили с этим растворителем.

Для оценки степени извлечения имидаклоприда и тиаклоприда в 0,5 мл крови и 200 мг измельченных органов вносили 1, 3, 5 и 10 мкл Конфидора экстра® и Калипсо®. Через 30 минут пробы экстрагировали ацетоном трижды, трехкратно превышая объем навесок, по 15 минут. Экстракты фильтровали через воронку с бумажным фильтром, заполненным натрия сульфатом безводным, в колбу для выпаривания и упаривали на ротационном испарителе при температуре водяной бани 40 °С досуха. Сухой остаток растворяли в 1 мл ацетонитрила и 20 мкл вводили в жидкостный хроматограф. При этом получали острые симметричные пики имидаклоприда и тиаклоприда с A_s = 1,000. Время удерживания для имидаклоприда составляет 2,69 мин., для тиаклоприда – 2,41 мин. (рис. 1, 3, 4, 6). Для апробации методики проводили определение остаточных количеств имидаклоприда и тиаклоприда в органах и тканях крыс, кроликов, цыплят и собак, интоксицированных Конфидором экстра® и Калипсо® (n = 250). Содержание остаточных количеств пестицидов в анализируемом образце вычисляли как среднее из 3 параллельных определений. Метрологическая характеристика метода представлена в таблице.

Заключение. Таким образом, способ определения имидаклоприда и тиаклоприда в биологических объектах с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии, основанный на применении «метода добавок малых навесок» и экстракции исследуемых проб ацетоном, чувствителен, легко воспроизводим и экономичен в осуществлении. Разработанная методика пригодна

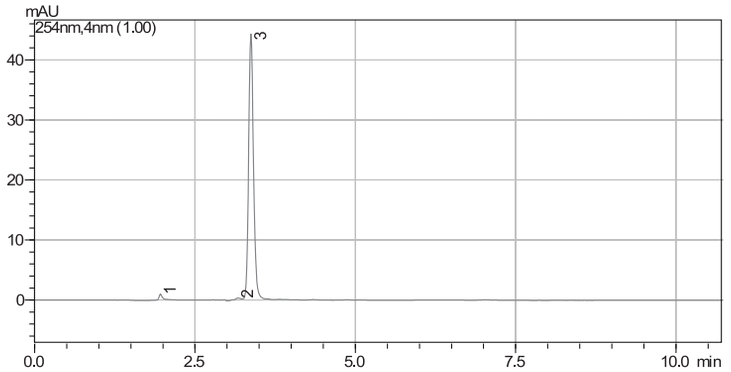


Рис. 4. Тиаклоприд стандарт 20мкг/мл в ацетонитриле, скорость потока 1 мл/мин

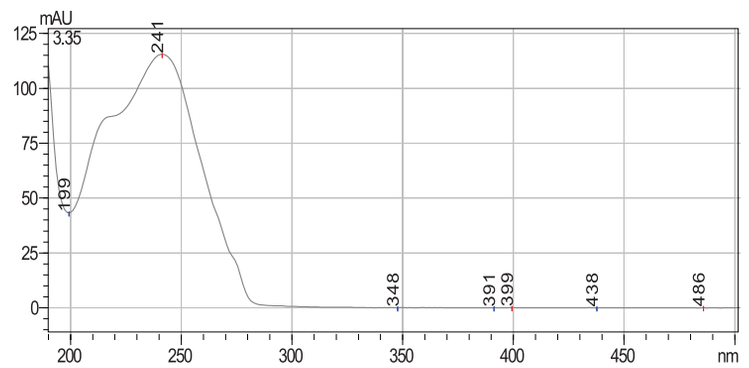


Рис. 5. УФ-спектр тиаклоприда

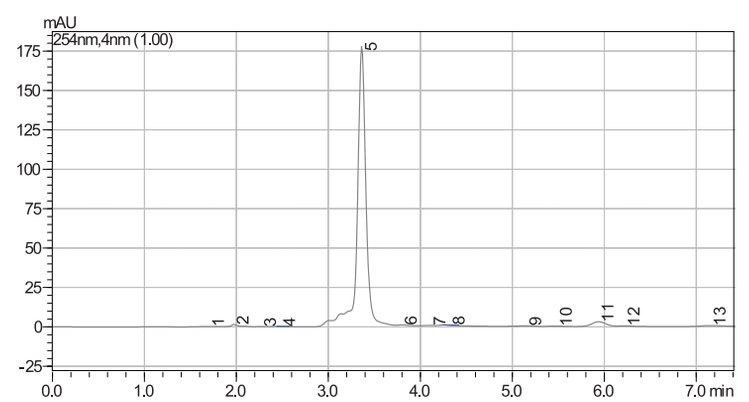


Рис. 6. Тиаклоприд (5) в крови через 4 часа после интоксикации крыс Калипсо в дозе 150 мг/кг массы, скорость потока 1 мл/мин

для осуществления определения остаточных количеств неоникотиноидов как в прижизненном (кровь, волосы), так и в посмертном (органы и ткани) биологическом материале.

Таблица

Метрологическая характеристика метода определения имидаклоприда и тиаклоприда в биологических объектах (n = 5, P = 0,95)

Анализируемая проба	Предел количественного определения, мг/кг	Среднее значение определения, %	Стандартное отклонение S, %	Доверительный интервал при α = 0,05, %
Кровь	0,0002	98,2	0,84	97,16–99,24
Содержимое желудка	0,001	98,0	1,0	96,76–99,24
Почка	0,001	98,4	0,55	97,72–99,08
Легкое	0,001	98,6	0,55	97,92–99,28
Мышечная ткань	0,001	98,8	0,45	98,24–99,36

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Еремина О.Ю., Лопатина Ю.В.* Перспективы применения неоникотиноидов в сельском хозяйстве России и сопредельных стран. Агрохимия. 2005; 6. – С. 87–93.
2. *Navalon A., Gonzalez-Casado A., El-Khattabi R., Vilchez J.L.* Determination of imidacloprid in vegetable samples by gas chromatography-mass spectrometry. Analyst. 1997; 122 (5). C. 579–581.
3. *Rancan M., Sabatini A.G., Achilli G, Galletti G.C.* Determination of imidacloprid and metabolites by liquid chromatography with an electrochemical detector and post column photochemical reactor. Anal. Chim. Acta. 2006; 555. P. 20–24.
4. *Wanatabe S., Ito S., Kamata Y., Omoda N., Yamazaki T., Munakata H., Kaneko T., Yuasa Y.* Development of competive enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) based on monoclonal antibodies for chloronicotinoid incecticides imidaclopрid and acetamiprid. Chim. Acta. 2001; 427. – P. 211–219.
5. *Segura Carretero A., Cruces-Blanco C., Perez Duran S., Fernandez Gutierrez A.* Determination of imidacloprid and its metabolite 6-chloronicotinic acid in greenhouse air by application of micellar electrokinetic capillary chroma tography with solid-phase extraction. J. Chromatogr. A. 2003; 1003. – P. 189–195.
6. *Guand-Guo Y., Rai S. K.* Simultaneous determination of imidacloprid, thiacloprid, and thiamethoxam in soil and water by high-perfomance liquid chromatography with diode-array detection. J. Environ-Sci. and Health. B. 2004; 39. – P. 737–746.
7. МУК 4.1.1390-03. Определение остаточных количеств имидаклоприда в воде, почве, огурцах, томатах, сахарной свекле, картофеле, перце и баклажанах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Available at: http//www.iprosoft.ru
8. МУК 4.1.1790-03. Методические указания по измерению концентрации имидаклоприда в воздухе рабочей зоны и атмосферном воздухе населенных мест методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Available at: http//www.iprosoft.ru
9. МУК 4.1.1802-03. Методические указания по определению остаточных количеств имидаклоприда в воде, почве, зерне и соломе зерновых колосовых культур, картофеле, пастбищных травах, огурцах, томатах и плодовых семечковых культурах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Available at: http//www.iprosoft.ru
10. *Ведищева Д. В., Соболева И. Г.* Изучение условий определения остаточных количеств неоникотиноидных инсектицидов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2009. Т. 9. Вып. 1. – С. 154–163.

T.V. Boyko[1], L.K. Gerunova[1], T.V. Gerunov[1], M.N. Gonohova[1], D.S. Goncharov[2], I.S. Pogodin[2], E.A. Luksha[2]

Detection of residual imidaclopride and thiarclopride in bio objects with a high performance liquid chromatography method

[1]Omsk State Agricultural University named by P.A. Stolypin" 644008, Omsk, Russian Federation
[2]Omsk State Medical Academy, 644043, Omsk, Russian Federation

A method of detection of residual imidaclopide and thiarclopide in bio objects (blood, animal internal organs and tissues) with a high performance liquid chromatography was developed.

Key words: *imidaclopride, internal organs and tissues, method of high performance liquid chromatography, thiarcloprid.*

ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ ТОКСИКОЛОГИЯ

УДК 57.044

Влияние цефазолина на состав и активность молекулярных форм малатдегидрогеназы активного ила

З.Е. Мащенко[1], И.Ф. Шаталаев[2], М.А. Шефер-Серебрякова[2]

[1] НОУ ВПО «Самарский медицинский институт «Реавиз», 443001, г. Самара,
[2] Самарский государственный медицинский университет, 443001, г. Самара

В работе представлены данные изменения состава и активности молекулярных форм малатдегидрогеназы водных микроорганизмов при действии цефазолина в зависимости от концентрации и времени инкубации в аэробно-анаэробных условиях. Установлено, что цитоплазматические молекулярные формы малатдегидрогеназы более чувствительны к токсическому действию антибиотика. Активность ферментов зависит от концентрации токсиканта.

***Ключевые слова**: цефазолин; малатдегидрогеназа; активный ил.*

Введение. В настоящее время лекарственные вещества относятся к новым органическим загрязнителям окружающей среды. Это связано с тем, что фармацевтические препараты в неизменном виде или в форме метаболитов переходят в сточные воды вместе с выделениями человека. В особенно значительных количествах они присутствуют в сточных водах медицинских учреждений (больниц, госпиталей и т.д.) [2]. В них наиболее часто обнаруживаются препараты антимикробного действия, вещества, обладающие гормональной активностью, а также нестероидные противовоспалительные лекарственные средства. Указанные вещества, как правило, мало разлагаются активным илом и проходят через муниципальные очистные сооружения транзитом, поступая затем в водоемы.

Присутствие лекарственных соединений в окружающей среде может приводить к нарушению физиологических процессов и репродуктивной функции живых организмов, появлению антибиотико-устойчивых штаммов бактерий, возникновению потенциально опасных химических смесей, содержащих метаболиты лекарственных веществ (как катализаторов нежелательных процессов) [5].

В стандартных установках широко используют биологические методы очистки сточных вод, в частности очистку активным илом. Активный ил – сложное сообщество микроорганизмов различных систематических групп и некоторых многоклеточных животных. Микроорганизмы, выделенные из активного ила, относятся к различным родам: *Actynomyces, Azotobacter, Bacillus, Bacterium, Corynebacterium, Desulfomonas, Pseudomonas, Sarcina* и др. Наиболее многочисленны бактерии рода *Pseudomonas*. Индикацию загрязнения активного ила ксенобиотиками можно осуществлять, используя биохимические показатели жизнедеятельности микроорганизмов, например, активность ферментов [3].

Для этого в первую очередь используются энзимы, контролирующие наиболее важные процессы обмена в живом организме. Преимуществом ферментативных тестов являются высокая чувствительность и селективность анализов. В литературе имеются работы, в которых предлагается использовать данные о составе молекулярных форм малатдегидрогеназы активного ила для биотестирования сточных вод. Малатдегидрогеназа (МДГ, К. Ф. 1.1.1.37) – аэробный фермент и катализирует взаимопревращение малата в оксалоацетат. Воздействие стрессоров на состав молекулярных форм МДГ многообразно по своей природе и может сводиться как к ингибированию, так и к их активации [4].

Цель данного исследования – изучение влияния цефазолина на состав и активность молекулярных форм малатдегидрогеназы активного ила.

Материалы и методы исследования. Объектом исследования служил антибиотик группы цефалоспоринов – цефазолин. Цефалоспорины на основе спектра действия классифицируются на четыре группы. Выбранный антибиотик относится к цефалоспоринам первого поколения, химическое строение которого представлено на рисунке 1.

Рис. 1. Химическое строение цефазолина

Цефазолин является цефалоспорином широкого спектра действия. Приблизительно 80% препарата после внутримышечного введения выводится через 24 часа почками в неизмененном виде [1].

В экспериментах использовали активный ил регенератора первой секции аэраторов городской станции МП «Самараводоканал».

Инкубацию осуществляли в течение 24 часов при температуре 20 °С в аэробно-анаэробных условиях.

Отбор проб для определения молекулярных форм МДГ проводили через 1 и 24 часа. Концентрацию цефазолина варьировали в количестве 10, 40 и 70 мг/г биомассы. Концентрации были подобраны в предварительных опытах.

Ферментные образцы получали по следующей методике: 10 мл иловой суспензии двукратно отмывали от фоновых загрязнений водой очищенной, центрифугировали при 3000g в течение 10 мин. Осадок переносили в механический дезинтегратор (стеклянная ступка и пестик на шлифах) и проводили дезинтеграцию клеток ила 5 мин при 4 °С. Дезинтеграт переносили в колбу, добавляли тритон Х-100, колбу помещали на магнитную мешалку на 2 часа для солюбилизации фермента. Гомогенат центрифугировали при 6000g 10 мин.

В супернатанте определяли молекулярные формы МДГ методом электрофореза в плоских блоках 7,5% полиакриламидного геля. В качестве электродного буфера использовали 1М трис-ЭДТА-боратный буфер (рН 9,2). Выявление изоформ МДГ проводили с помощью феназинметасульфаттетразолиевой реакции в чашках Петри [4]. Путем прямой денситометрии определяли относительную активность каждой зоны во всех образцах на анализаторе фореграмм АФ-1 (Львовприбор).

Относительную активность отдельных молекулярных форм МДГ устанавливали методом прямой денситометрии после иссечения активных зон из плоских блоков 7,5% полиакриламидного геля.

Изменение относительной активности отдельных молекулярных форм в пробах рассчитывали как процентное отношение относительной активности в опытной пробе к относительной активности в контрольной пробе.

Результаты и обсуждение. В таблице 1 представлены состав и относительная активность молекулярных форм МДГ активного ила при действии цефазолина после 1 часа и 24 часов инкубации.

В течение первого часа инкубации в контроле выявлены две молекулярные формы фермента – МДГ-1 и МДГ-3. При действии цефазолина различной концентрации на микроорганизмы активного ила также обнаружены две молекулярные формы фермента, причем в области МДГ-3 установлены две активные зоны. С увеличением концентрации антибиотика отмечено уменьшение активности МДГ-1 и увеличение активности МДГ-3.

По истечению суток в контрольной пробе установлены три молекулярные

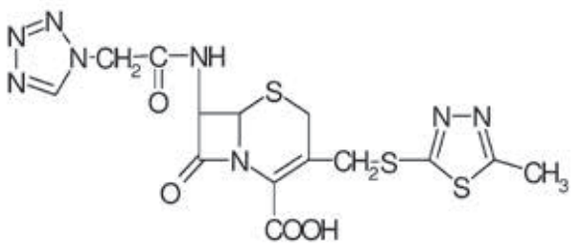
Мащенко Зинаида Евгеньевна (Mashchenko Zinaida Evgenievna) , канд. фарм. наук, доцент, кафедра фармации, НОУ ВПО «Самарский медицинский институт «Реавиз», mzinaida@yanex.ru
Шаталаев Игорь Федорович (Shatalaev Igor Fedorovich), доктор биол. наук, профессор, Самарский государственный медицинский университет, info@samsmu.ru
Шафер-Серебрякова Мария Александровна (Shefer-Serebryakova Mariya Aleksandrovna), ассистент, кафедра химии фармацевтического факультета, Самарский государственный медицинский университет, sma-mariya-79@mail.ru

формы – МДГ-1, МДГ-2 и МДГ-3, при этом область МДГ-2 представлена в виде трех зон активности. По активности МДГ-2 превосходит другие молекулярные формы. В опытной серии при инкубации с цефазолином с содержанием 10 мг/г биомассы число активных зон МДГ-2 и МДГ-3 становится равным двум. Причем активность молекулярных форм МДГ-1 и МДГ-2 резко снижается на фоне активации МДГ-3. В пробе с содержанием антибиотика 40 мг/г биомассы число активных зон МДГ-2 и МДГ-3 не меняется, но в области МДГ-1 установлены две активные зоны. Следует отметить возрастание активности МДГ-1 при дальнейшем уменьшении активности МДГ-2. При инкубации цефазолина в концентрации 70 мг/г биомассы МДГ-2 не выявлена. Активность МДГ-3 значительно превышает активность МДГ-1.

Динамика изменения относительной активности отдельных молекулярных форм МДГ во времени инкубации представлена в таблице 2.

В течение первого часа инкубации во всех опытных образцах установлено увеличение активности молекулярной формы МДГ-1, не зависящее от концентрации цефазолина в пробе. Однако повышение содержания антибиотика в опытных образцах активирует МДГ-3 .

При инкубации в течение суток получены следующие результаты: серии экспериментов с содержанием цефазолина 10 мг/г биомассы приводили к снижению активности МДГ-1, а при концентрациях 40 и 70 мг/г биомассы – к стабильному увеличению активности МДГ-1. Повышение концентрации антибиотика в опытных пробах приводило к полному ингибированию активных зон МДГ-2, отмечено снижение активности молекулярной формы МДГ-3.



Заключение. Полученные данные свидетельствуют, что в первый час инкубации с увеличением концентрации цефазолина усиливаются аэробные процессы окисления в активном иле. Активация МДГ-2 в контроле по истечению суток говорит об усилении процессов окисления в цитозоле клетки микроорганизмов, что может быть следствием недостаточной аэрации активного ила. Данные экспериментов, полученные после 24-часовой инкубации антибиотика в активном иле, показывают, что с увеличением концентрации лекарственного вещества происходит ингибирование цитоплазматических молекулярных форм МДГ-1 и МДГ-2 и активирование мембраносвязанной МДГ-3.

Токсикологическая опасность цефазолина связана с мембранотропным характером этого вещества, что подтверждается фармакологической характеристикой лекарственного препарата [1].

Полученные данные важны для понимания опасности антропогенных нарушений экологических процессов, существенных для очищения воды в водных экосистемах.

Таблица 1

Относительная активность молекулярных форм МДГ, %

Молекулярные формы	Контроль	Концентрация антибиотика, мг/г биомассы		
		10	40	70
	1 час			
МДГ-1	17,5	11,6	9,0	7,0
МДГ-3	82,3	44,3	40,2	42,0
		44,0	50,1	50,1
	24 часа			
МДГ-1	20,8	8,0	13,5	10,3
			5,5	5,4
МДГ-2	8,7	2,6	1,0	-
	8,1	1,7	1,0	
	26,0			
МДГ-3	36,8	50,1	33,0	66,7
		36,8	46,4	17,7

Таблица 2

Изменение активности отдельных молекулярных форм, %

Молекулярные формы	Концентрация антибиотика, мг/г биомассы		
	10	40	70
	1 час		
МДГ-1	+ 41,94	+ 47,31	+ 47,31
МДГ-2	–	–	–
МДГ-3	+ 35,14	+ 69,59	+ 158,11
	24 часа		
МДГ-1	–56,67	+ 206,67	+ 118,00
МДГ-2	–62,05	–66,84	–
МДГ-3	+ 180,60	+ 94,03	+ 49,25

Z.E. Mashchenko[1], I.F. Shatalaev[2], M.A. Shefer-Serebryakova[2]

Impact of cefazolin on the structure and activity of malate dehydrogenase molecular forms in active silt

[1] Samara Medical Institute «REAVIZ», 443001, Samara, Russian Federation
[2] Samara State Medical University, 443001, Samara, Russian Federation

Are submitted data on changes in the composition and activity of malate dehydrogenase molecular forms in water microorganisms under the influence of cefazolin depending on the concentration and incubation time under aerobic-anaerobic conditions. It was found out that malate dehydrogenase cytoplasmatic molecular forms are more sensitive to the toxic action of antibiotics. The activity of enzymes depends on toxicant concentrations.

Key words: *activated sludge, cefazolin, malate dehydrogenase*

Материал поступил в редакцию 28.05.2012 г.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Машковский М.Д.* Лекарственные средства. – 15-е изд., перераб., испр. и доп. – М.: РИА «Новая волна»: Издатель Умеренков, 2007. – 1206 с.
2. *Некрасова Л. В., Русских Я. В., Новиков А. В., Краснов Н. В., Жаковская З. А.* Применение метода (ВЭЖХ – тандемной МС высокого разрешения) для определения лекарственных соединений в природной воде // Научное приборостроение. – 2010. – Т. 20. – № 4. – С. 59–66.
3. *Сазыкин Ю.О., Орехов С.Н., Чакалева И.И.* Биотехнология: учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений. – 3-е изд., стер. – М.: Издательский центр «Академия», 2008. – 256 с.
4. *Шаталаев И.Ф., Телитченко М.М.* Молекулярные формы малатдегидрогеназы активного ила в процессе очистки сточных вод на городских станциях аэрации // Химия и технология воды. – 1992. – Т. 14. – № 9. – С. 713–717.
5. *Pascoe D., Karntanut W., Muller C.T.* Do pharmaceuticals affect freshwater invertebrates? A study with the cnidarian Hydra vulgaris // Chemosphere. – 2003. – № 51. – P. 521–528.

УДК 57.044 :597

А.С.Федотов

Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии (ФГУП «ВНИРО»), 107140, г. Москва, Россия

Оценка токсичности ингибиторов коррозии «Азол 5040» и «Азол 5041» для рыб

Проведена оценка токсичности токсичности ингибиторов коррозии «Азол 5040» и «Азол 5041» для стандартного тест-объекта: рыб – односуточных мальков гуппи (*Poecillia reticulate* Peters). Для оценки токсического эффекта для рыб использовали показатели медианных летальных концентраций ($ЛК_{50}$), характеризующие изменение выживаемости (гибель) рыб на 50% за определенное время – 96 часов ($ЛК_{50}$/96ч). По результатам оценки токсичности препаратов установлено: ингибитор коррозии «Азол 5040» относится к малотоксичным веществам; ингибитор коррозии «Азол 5041» – к среднетоксичным веществам.

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

Введение. В настоящее время для защиты от внутренней коррозии напорных и выкидных трубопроводов, транспортирующих обводненные газожидкостные и нефтяные среды, содержащие сероводород и углекислый газ, применяются ингибиторы коррозии «Азол 5040» и «Азол 5041» (тал. 1,2).

Ингибиторы коррозии «Азол 5040» и «Азол 5041» представляют собой подвижные жидкости от светло-коричневого до темно-коричневого цвета.

Задачей данной работы служила оценка токсичности ингибиторов коррозии «Азол 5040» и «Азол 5041» для стандартного пресноводного тест-объекта: рыб – односуточных мальков гуппи (*Poecillia reticulate* Peters).

Материалы и методы исследования. Для оценки токсичности ингибиторов коррозии «Азол 5040» и «Азол 5041» использовали стандартный пресноводный тест-объект: мальков рыб – односуточных гуппи *Poecillia reticulate* Peters.

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 2001г.), изд. РЭФИ, НИА-Природа, М., 2002) [5].

Определяли $ЛК_{50}$ ингибиторов коррозии «Азол 5040» и «Азол 5041» на рыбах за 4 суток (96 часов). Мальки рыб - *Poecillia reticulate* Peters – гуппи, широко распространенная аквариумная живородящая рыбка. В природе встречается как в пресной, так и в соленой воде, используются 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 ингибиторов коррозии «Азол 5040» и «Азол 5041» проводили в аквариальной, с использованием рассеянного света и естественного светового периода. Длительность биотестирования составляла 4 суток (96 часов). 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 в литре, 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).

Опыты на молоди рыб проведены в трехкратной повторности. Каждому опыту соответствовал контроль (без внесения препаратов). По окончании опытов методом пробит-анализа по В.Б. Прозоровскому [4] рассчитывали параметры токсичности: $ЛК_{50}$. Степень острой токсичности ингибиторов коррозии «Азол 5040» и «Азол 5041» для рыб оценивали согласно классификации Лесникова Л.А. и Вро-

Федотов Анатолий Сергеевич (Fedotov Anatoly Sergeyevich), кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник ФГУП «ВНИРО», vniro@vniro.ru

Таблица 1

Компонентный состав ингибитора коррозии «Азол 5040» [2]:

№ п/п	Компонент	Характеристика исходного сырья ГОСТ, ТУ	Содержание компонентов, %
1.	Композиция азотсодержащих ПАВ		25 – 26
2.	Метанол**	ГОСТ 2222-78	34 – 36
3.	Вода		До 100

Таблица 2

Компонентный состав ингибитора коррозии «Азол 5041» [3]:

№ п/п	Компонент	Характеристика исходного сырья ГОСТ, ТУ	Содержание компонентов, %
1.	Композиция азотсодержащих ПАВ		23 – 26
2.	Моноэтаноламин	ТУ 2423-065-05807977-2004	0,5 – 1,0
3.	Акриловая кислота	ТУ 2431-001-52470063-2002	0,5 – 1,0
4.	Метанол	ГОСТ 2222-78	33 – 36
5.	Бутанол	ГОСТ 5208-81	1 – 5
6.	КОБС (2-этилгексанол)	ТУ 2421-101-05766575-2001	1 - 5
7.	Вода		До 100

чинского К.К. [1].

Результаты и обсуждение. Результаты исследования токсичности ингибитора коррозии «Азол 5040» на односуточных гуппи в остром опыте длительностью 96 часов представлены в таблице 3.

Представленные в таблице 3 данные показывают, что на 4-е сутки опыта в концентрации препарата 100,0 мг/л наблюдается гибель односуточных мальков гуппи, составляющая 100%.

В концентрациях 60,0 и 80,0 мг/л на 2–4-е и 1–4-е сутки опыта отмечена гибель мальков рыб составляющая, соответственно, 6,7–33,3 и 13,3–73,3% по сравнению с контролем.

В концентрациях препарата 10,0–40,0 мг/л гибели односуточных мальков гуппи не отмечено на протяжении всей экспозиции опыта.

Расчетная полулетальная концентрация ($ЛК_{50}$ за 96 ч) ингибитора коррозии «Азол 5040» для односуточных мальков гуппи составила 67,6 мг/л.

Результаты исследований по изучению динамики выживаемости односуточных мальков гуппи в растворах с различными концентрациями ингибитора коррозии «Азол 5041» в остром опыте длительностью 96 часов представлены в таблице 4.

Представленные в таблице 4 данные показывают, что на 4-е сутки опыта в концентрации препарата 60,0 мг/л наблюдается 100%-ная гибель односуточных мальков гуппи.

В концентрациях 30,0; 40,0 и 50,0 мг/л на 3–4-е, 2–4-е и 1–4-е сутки опыта отмечена статистически достоверная гибель мальков, составляющая, соответственно, 3,3–13,3; 6,7–40,0 и 6,7–73,3% по сравнению с контролем.

В концентрациях препарата 10,0 и 20,0 мг/л гибели мальков рыб не отмечено на протяжении всей экспозиции опыта.

Расчетная полулетальная концентрация ($ЛК_{50}$ за 96 ч) ингибитора коррозии «Азол 5041» для односуточных мальков гуппи составила 44,8 мг/л.

При исследовании токсичности ингибиторов коррозии «Азол 5040» и «Азол 5041» результат оценивается по концентрации, вызвавшей гибель 50% тест-организмов – односуточных мальков гуппи.

Обобщенные результаты исследования токсичности ингибиторов коррозии «Азол 5040» и «Азол 5041» по оценке их полулетальных концентраций ($ЛК_{50}$) для рыб – односуточных мальков гуппи представлены в таблице 3.

Данные таблицы 5 показывают, что для ингибиторов коррозии «Азол 5040» и «Азол 5041» полулетальными концентрациями ($ЛК_{50}$) для односуточных мальков гуппи при острой 96-часовой экспозиции являются, соответственно, 67,6 и 44,8 мг/л.

Согласно классификации Л.А. Лесникова и К.К. Врочинского [3] по степени острой токсичности к односуточным малькам гуппи ингибитор коррозии Азол-5040 оценивается как малотоксичный ($ЛК_{50}$ от 50,0 до 500,0 мг/л); ингибитор коррозии Азол-5041 оценивается как среднетоксичный ($ЛК_{50}$ от 1,0 до 50,0 мг/л).

Выводы. Согласно классификации Л.А. Лесникова и К.К. Врочинского [3] исследованные препараты по степени острой токсичности для рыб оцениваются как:

– ингибитор коррозии Азол-5040 – малотоксичный ($ЛК_{50}$ от 50,0 до 500,0 мг/л) для водных организмов ($ЛК_{50}$ для односуточных мальков гуппи 67,6 мг/л);

– ингибитор коррозии Азол-5041 – среднетоксичный ($ЛК_{50}$ от 1,0 до 50,0 мг/л) для водных организмов ($ЛК_{50}$ для односуточных мальков гуппи 44,8 мг/л).

Таблица 3

Динамика выживаемости односуточных гуппи в растворах с различными концентрациями ингибитора коррозии «Азол 5040» в остром опыте, 96 часов, n = 30

Концентрация, мг/л	Сутки опыта			
	1	2	3	4
	Выживаемость организмов, экз.			
Контроль	30	30	30	30
10,0	30	30	30	30
20,0	30	30	30	30
40,0	30	30	30	30
60,0	30	28	24	20
80,0	26	20	13	8
100,0	14	11	4	0
% от контроля				
Контроль	100	100	100	100
10,0	100	100	100	100
20,0	100	100	100	100
40,0	100	100	100	100
60,0	100	93,3	80,0	66,7
80,0	86,7	66,7	43,3	26,7
100,0	46,7	36,7	13,3	0

Таблица 4

Динамика выживаемости односуточных мальков гуппи в растворах с различными концентрациями ингибитора коррозии «Азол 5041» в остром опыте, 96 часов, n = 30

Концентрация, мг/л	Сутки опыта			
	1	2	3	4
	Выживаемость организмов, экз.			
Контроль	30	30	30	30
10,0	30	30	30	30
20,0	30	30	30	30
30,0	30	30	29	26
40,0	30	28	25	18
50,0	28	23	16	8
60,0	12	8	2	0
% от контроля				
Контроль	100	100	100	100
10,0	100	100	100	100
20,0	100	100	100	100
30,0	100	100	96,7	86,7
40,0	100	93,3	83,3	60,0
50,0	93,3	76,7	53,3	26,7
60,0	40,0	26,7	6,7	0

Таблица 5

Сводная таблица результатов исследования токсичности ингибиторов коррозии «Азол 5040» и «Азол 5041» для односуточных мальков гуппи, экспозиция 96 часов

	Величина полулетальной концентрации ($ЛК_{50}$), мг/л	Степень токсичности
Ингибитор коррозии «Азол 5040»	67,6	Малотоксичный
Ингибитор коррозии «Азол 5041»	44,8	Среднетоксичный

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Методические указания по рыбохозяйственной оценке пестицидов. ГосНИОРХ., Л., 1973.
2. Паспорт качества №1474 на ингибитор коррозии Азол 5040 ТУ 2458-086-00205423-2009, М., Котласский химический завод, г. Коряжма Архангельской области, 2009 г. – 1 с.
3. Паспорт качества №623 на ингибитор коррозии Азол 5041 ТУ 2458-090-00205423-2009, М., Котласский химический завод, г. Коряжма Архангельской области, 2010 г. – 1 с.
4. *Прозоровский В.Б.* Использование метода наименьших квадратов для пробит-анализа кривых летальности/ Фармакология и токсикология. – М., 1962. – С. 68-79.
5. Руководство по определению методом биотестирования токсичности вод, донных отложений, загрязняющих веществ и буровых растворов. Утв. МПР России 27 апреля 2001г. Изд. РЭФИ, НИА-Природа, М., 2002 г.

A.S. Fedotov

Assessment of toxicity of corrosion inhibitors «Azol 5040» and «Azol 5041» for fish

All-Russian Institute of Fisheries and Oceanography, 107140, Moscow, Russian Federation

The assessment of toxicity of corrosion inhibitors «Azol 5040» and «Azol 5041» was performed for a standard fish test-object: a day old guppy baby fishes (Poecillia reticulate Peters). To assess toxic effect on fishes, indicators of median lethal concentrations (LC_{50}) were used which characterize 50% changes in fish survival (death) for a determined period-96h (LD_{50}/96h). Based on assessment results of preparations toxicity, it was established that corrosion inhibiter «Azol 5040» can be allocated to low toxic substances and corrosion inhibiter «Azol 5041» refers to moderately toxic substances.

Key words: preparations, fish, young fishes, toxicity

Материал поступил в редакцию 21.05.2012 г.

СЪЕЗДЫ, КОНФЕРЕНЦИИ, СОВЕЩАНИЯ

Итоги Международного семинара по вопросам управления безопасным обращением химической продукции

27 и 28 июня 2013 года, в Москве, проводился семинар по вопросам управления безопасным обращением химической продукции, организованный Российским Союзом Химиков совместно с Комиссией ЕвроСоюза (European Commission), Европейским Советом химической промышленности (Cefic) и Международным Советом Химических Ассоциаций (ICCA). В семинаре приняли участие более 80 специалистов и экспертов в области технического регулирования и НИОКР.

Ключевыми темами для обсуждения были следующие:

1. Добровольные инициативы промышленности (программа «Ответственная забота» (англ. – Responsible Care), глобальная стратегия управления продукцией (англ. – Global Product Strategy (GPS))).

2. Государственное регулирование (европейский регламент Регламент № 1907/2006 Европейского Парламента и Совета по регистрации, оценке, разрешению и ограничению химикатов (REACH – Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals)[1] и регламент № 1272/2008 Европейского Парламента и Совета по классификации, маркировке и упаковке веществ и смесей (CLP – Classification, Labelling, Packing), требования к проведению исследований в соответствии с принципами надлежащей лабораторной практики (англ. – Good Laboratory Practice (GLP).

1. Программа «Ответственная забота». В рамках данной секции эксперт РСХ, ведущий научный сотрудник кафедры ЮНЕСКО «Зеленая химия для устойчивого развития» РХТУ им. Д.И. Менделеева Макарова А.С. выступила с докладом об успешной реализации программы Ответственная забота» в странах БРИК. В ходе доклада были отмечены основные проблемы внедрения программы «Ответственная забота», ожидаемые выгоды и преимущества внедрения и развития такого инструмента программы, как интегрированная система менеджмента (ИСМ). Представлены приоритетные направления деятельности внедрения/развития ИСМ на предприятии, по каждому из которых может быть получен значимый практический результат.

Директор ФБУЗ «Российский регистр потенциально опасных химических и биологических веществ» Роспотребнадзора Хамидулина Х.Х. представила презентацию о государственном регулировании в России и странах Таможенного союза и управлении рисками при обращении химической продукции.

Менеджер Cefic по программе «Ответственная забота» Sjoerd Looijs представил на семинаре основные направления развития программы, которая по его мнению является гибкой и легко модифицируемой. Он выступил с предложением о разработке системы измерений ключевых показателей для проведения оценки участников программы «Ответственная забота». Mr. Sjoerd Looijs предложил изменить «нисходящий» подход к внедрению программы, т.к. этот подход представляет на практике только выполнение требований.

В заключении секции пресс-секретарь РСХ Ярцева Д.В. представила проводимое РСХ «Исследование частно-государственного партнерства экономик стран АТЭС по продвижению инициатив промышленности (Responsible care)». Исследование предполагает оценить возможность и найти доказательства построения частно-государственного партнерства во внедрению программы «Ответственная забота» в странах АТЭС. Представленный проект вызвал большой интерес среди промышленности.

2. Глобальная стратегия управления продукцией (англ. – Global Product Strategy (GPS)). Менеджер Cefic в области Международного регулирования химических веществ Leo Heezen выступил с докладом о GPS, представив ее в качестве основного инструмента оценки рисков, возникающих при обращении химической продукции. Он отметил, что основной целью GPS является увеличение степени доверия общественности и улучшение имиджа. Leo Heezen представил процедуру оценки риска GPS, состоящую из 8 этапов. Итоговый отчет о безопасности GPS дает пояснения относительно возможных опасностей и сценариев воздействия, а также информацию об управлении рисками. Американский совет химической промышленности создал портал доступа (IT-портал) к отчетам по управлению продукцией. Представитель компании BASF рассказал о выгодах и преимуществах, получаемых при внедрении GPS. В качестве основных преимуществ были выделены такие как: сохранение отношений со всеми партнерами (прозрачность), готовность к изменениям, «лицензия на деятельность» – неформальное одобрение внешними заинтересованными сторонами осуществляемой деятельности. Представитель компании Clariant Erika Kunz, занимающая должность Руководителя отдела по глобальной регистрации и оценки химических веществ, представила на семинаре презентацию, в которой сравнила между собой системы GPS и Паспортов безопасности. По словам Erika Kunz, целью GPS будет обобщение к 2020 году информации, достаточной для проведения оценки безопасности химических веществ на предприятии. Эта информация будет доступна для всех заинтересованных сторон. В докладе были рассмотрены сходства и различия паспортов безопасности и отчетов и кратких резюме составляемых в соответствии с GPS. Также Ms Erika Kunz рассказала о реализации программы GPS в компании Clariant. Были продемонстрированы основные практические результаты деятельности и преимущества использования инструментов GPS для управления рисками.

3. Европейские регламенты REACH and CLP. Petteri Makela из Европейского Химического Агентства представил на семинаре презентацию о причинах изменений и дополнений REACH, а также выявленный положительный опыт в подготовке и регистрации химической продукции. В своем докладе он коснулся вопросов порядка проведения регистрации химической продукции, и отметил, что REACH нуждается в корректировке и улучшении путем внедрения оптимизации на всех уровнях производства. Leo Heezen выступил с докладом об инструментах передачи информации по цепи поставок связь, GPS резюме, расширенные SDS, а также использование IT-инструментов.

Представитель инспекции по химическим веществам (институт окружающей среды и безопасности пищевых продуктов при правительстве земли Форарльберг) Mr Eugen Anwander рассмотрел на семинаре основные проблемы и трудности с которыми сталкиваются предприятия при проведении классификации и маркировки химических веществ и их смесей в соответствии CLP.

4. Наилучшие лабораторные практики. Pirkko Puranen,Старший инспектор Финского агентства по лекарственным средствам, выступил с сообщением, в котором содержались общие сведения о GLP и были рассмотрены основные принципы Надлежащей лабораторной практики, которые применяются в лабораториях, проводящих испытания для оценки влияния химической продукции на окружающую среду и здоровье. Также в ходе презентации были представлены руководящие документы OECD по GLP и было отмечено, что каждая из страна-участник программы назначает специальные органы, ответственные за проведение оценки в соответствии с требованиями GLP. Было отмечено, что данные о лаборатории и результатах проверки строго конфиденциальны.

Guido Jacobs, Руководитель органа GLP мониторинга (Министерство здравоохранения и безопасности продуктов питания охраны окружающей среды, Бельгия), представил на семинаре презентацию о документах, в которых содержится обязательство проводить испытания по GLP, используемых в ЕС. И рассмотрел проблемы признания данных, представляемых не европейскими производителями, по таким причинам, как отсутствие достаточной информации о характеристиках исследуемого продукта, несоблюдение условий транспортировки и др.

В заключение семинара участниками, после обсуждения текущего состояния в области регулирования обращения химической продукции и химических веществ, были сформулированы следующие предложения:

1. Способствовать объединению усилий органов исполнительной власти и отраслевого бизнес-сообщества в части обеспечения химической безопасности.

2. Российскому Союзу Химиков дать предложения в Комитет Государственной думы по промышленности и в другие органы исполнительной власти по использованию добровольных инициатив промышленности в регулировании химической безопасности и внесении соответствующих изменений в разрабатываемые законодательные акты.

3. Предложить CEFIC совместно с РСХ разработать дорожную карту по вовлечению России в глобальную деятельность по обеспечению безопасности при обращении химической продукции, включающую в себя развитие в РФ программы RC и участие в GPS. Просить CEFIC со своей стороны способствовать подключению европейских компаний, экспортеров в РФ к данной деятельности, в том числе помочь РСХ в разработке мотивации для этих компаний.

4. Представителям Российских компаний обсудить с руководством возможность активного участия в создании/развитии на их предприятии программы Responsible Care и готовность принять участие в информационно-обучающей программе, включающей в себя анкетирование предприятия и составление последующего плана действий.

5. Просить Российские предприятия поддержать инициативу РСХ совместно с БАСФ по разработке российского портала по GPS и начать работу по подготовке данных документов для последующего размещения их на портале.

Макарова А.С.,
ведущий научный сотрудник
кафедры ЮНЕСКО
«Зеленая химия для устойчивого развития»
РХТУ им. Д.И. Менделеева

(Endnotes)
Regulation EC № 1907/2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), establishing a European Chemicals Agency, amending Directive 1999/45/EC and repealing Council Regulation (EEC) No 793/93 and Commission Regulation (EC) No 1488/94 as well as Council Directive 76/769/EEC and Commission Directives 91/155/EEC, 93/67/EEC, 93/105/EC and 2000/21/EC. http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/¬LexUriServ.do?uri¬=CONSLEG:2006R1907:20121009:EN:PDF (дата обращения: 19.02.2013)

Бюллетень

Российского регистра потенциально опасных химических и биологических веществ

НОВЫЕ СВЕДЕНИЯ О ТОКСИЧНОСТИ И ОПАСНОСТИ ХИМИЧЕСКИХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ

УДК:615.9(547.533):616-001.8

Влияние пренатальной гипоксии на характер нейротоксического эффекта толуола у крыс

В.А Вокина, Л.М. Соседова, Е.В. Катаманова, В.С. Рукавишников, О.М. Журба

Ангарский филиал ФГБУ «ВСНЦ ЭЧ» СО РАМН – НИИ медицины труда и экологии человека, 665827, г. Ангарск

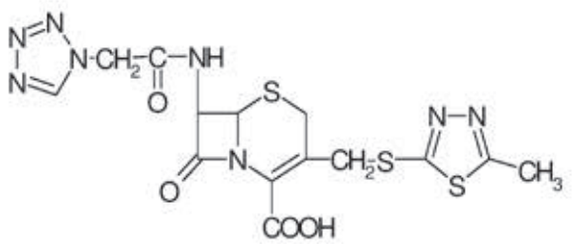
Рассматриваются вопросы изменений биоэлектрической активности коры головного мозга белых крыс после ингаляционного воздействия толуола. Установлены особенности нарушений показателей ЭЭГ при интоксикации у животных с нормальным и нарушенным течением эмбрионального развития. Показано, что острое гипоксическое воздействие на ранних этапах органогенеза (13–14-й день беременности) приводит к выраженным изменениям биопотенциалов головного мозга у животных, подвергавшихся в половозрелом возрасте воздействию толуола, являясь при этом отягощающим фактором. Вероятно, этот эффект связан с нарушением баланса процессов торможения и возбуждения подкорковых нейронов зрительной зоны коры головного мозга крыс.

Ключевые слова: *толуол; белые крысы; электроэнцефалография; пренатальная гипоксия.*

Введение. Современный человек на протяжении всей жизни подвержен влиянию множества вредных нейротропных факторов, при этом степень выраженности нарушений ЦНС может варьировать в зависимости от исходного состояния его здоровья. Высокая чувствительность отдельных лиц к действию нейротоксикантов может быть определена генетическими особенностями, наличием каких-либо хронических заболеваний и т.п. Нами выдвинута гипотеза о внутриутробной гипоксии как факторе возможного риска формирования нарушений нервной системы при последующем воздействии токсикантов в процессе онтогенеза человека. То есть, последствия внутриутробной гипоксии могут оказывать влияние на течение нейроинтоксикации у взрослого организма. Известно, что гипоксические повреждения в период эмбриогенеза приводят к гибели или увеличивают риск возникновения психических и нейродегенеративных заболеваний с возрастом [2, 5]. Одним из распространенных веществ, действующих преимущественно на нервную систему, является толуол, входящий в состав многочисленных потребительских товаров и применяемый в качестве растворителя во многих технологических процессах. В связи с этим возможно загрязнение им атмосферного воздуха и воздуха производственных и жилых помещений и, как следствие, возникновение острых и хронических отравлений [3, 6]. *Целью настоящей работы* являлось изучение подострого влияния толуола на уровне 150 ppm на биоэлектрическую активность головного мозга белых крыс, подвергавшихся острой пренатальной гипоксии.

Материалы и методы исследования. Опыты поставлены на 30 нелинейных белых крысах-самках и 60 самцах их половозрелого потомства, массой 180–240 г. Фиксированный срок беременности определяли общепринятым методом по наличию сперматозоидов во влагалищных мазках. Беременным самкам подкожно вводили раствор нитрита натрия на 13–14-й день беременности в дозе 50 мг/кг. Самки контрольной группы получали инъекции физиологического раствора в том же режиме. За два дня до предполагаемой даты родов крыс рассаживали в отдельные клетки. Крысята всех групп были отсажены от матерей и разделены по полу на 30-й день жизни. В дальнейшем из полученного потомства в эксперименте использовались только самцы. В возрасте 2,5–3 месяцев часть контрольных животных и животных с пренатальной гипоксией (по 20 крыс), подвергали динамическому ингаляционному воздействию толуола в затравочных камерах объемом 200 л, в дозе 560 мг/м^3, 4 часа в день, 5 дней в неделю, в течение 4 недель. В итоге было сформировано 3 группы крыс: 1) животные без пренатальной гипоксии, подвергавшиеся воздействию толуола в половозрелом возрасте; 2) крысы, перенесшие острую гемическую гипоксию на 13–14-й день эмбрионального развития и подвергавшиеся воздей-

Вокина Вера Александровна (Vokina Vera Aleksandrovna), младший научный сотрудник лаборатории токсикологии, Ангарский филиал ФГБУ «ВСНЦ ЭЧ» СО РАМН – НИИ медицины труда и экологии человека, vokina.vera@gmail.com
Соседова Лариса Михайловна (Sosedova Larisa Michailovna), зав. лабораторией токсикологии, д.м.н., профессор, Ангарский филиал ФГБУ «ВСНЦ ЭЧ» СО РАМН – НИИ медицины труда и экологии человека, imt@mail.ru
Катаманова Елена Владимировна (Katamanova Elena Vladimirovna), зам. главного врача по медицинской части, к.м.н., Ангарский филиал ФГБУ «ВСНЦ ЭЧ» СО РАМН – НИИ медицины труда и экологии человека, imt@mail.ru
Рукавишников Виктор Степанович – директор института, член-корр. РАМН, д.м.н., профессор, Ангарский филиал ФГБУ «ВСНЦ ЭЧ» СО РАМН – НИИ медицины труда и экологии человека, imt@mail.ru
Журба Ольга Михайловна (Ghurba Olga Mikhailovna), зав. лабораторией физико-химических методов исследования, к.б.н., Ангарский филиал ФГБУ «ВСНЦ ЭЧ» СО РАМН – НИИ медицины труда и экологии человека, imt@mail.ru



ствию толуола в половозрелом возрасте; 3) контрольные животные.

Исследование ритмической электрической активности коры головного мозга животных проводили через 4 недели после окончания экспозиции. Стереотаксические манипуляции выполняли с использованием координат стереотаксического атласа мозга взрослой крысы [12] под анестезией (кетамин внутрибрюшинно 0,15 мл/100 г, рометар внутрибрюшинно 0,075 мл/100 г массы). Электроды вживляли в сенсомоторную и зрительную зоны коры головного мозга белых крыс. Индифферентный электрод вживляли в носовые кости. Регистрацию ритмической электрической активности коры головного мозга белых крыс проводили на 3–4-й день после вживления электродов с использованием многофункционального комплекса для исследования ЭЭГ и ВП «Нейрон-Спектр-4» (ООО «Нейрософт», Россия). Определяли мощность отдельных диапазонов, деление на диапазоны проводили в пределах следующих значений частот: δ – диапазон 0,5–4,0 Гц, θ – диапазон 4,0–8,0, α – диапазон 8,0–3,0, $\beta 1$ – диапазон 13,0–22,0 и $\beta 2$ – диапазон – 22,0–32,0 Гц [2], а также оценивали зрительные и слуховые вызванные потенциалы (ЗВП и СВП).

Животные содержались в стандартных условиях вивария со свободным доступом к воде и пище. Все исследования проводили в соответствии с «Правилами лабораторной практики» (Приказ Минздравсоцразвития России от 26 августа 2010 г. № 708н).

Полученные материалы исследований обработаны методами непараметрической (метод Краскела-Уоллиса и критерии Манна-Уитни) статистики с использованием ППП Statistica 6.0. (StatSoft) (лиц. № AXXR004E642326FA). Результаты представлены в виде медианы и интерквантильного интервала.

Результаты и обсуждения. Анализ амплитудных показателей основных диапазонов ЭЭГ в отведении из проекции зрительной зоны коры в фоновой записи показал, что у белых крыс после интоксикации толуолом (группа №1) выявлено статистически значимое повышение индексов θ- и $\beta 1$-ритмов и снижение индекса δ-ритма по сравнению с контролем (табл. 1). В отведении из проекции сенсомоторной зоны коры статистически значимых изменений не было выявлено.

В пробе со СВП у животных данной группы выявлено снижение амплитуды пика N1 в 8,7 раза и пика P3 в 4 раза по сравнению с группой контроля ($p = 0,02$ и $p = 0,04$ соответственно, табл. 2). При проведении проб с применением ЗВП наблюдалось снижение амплитуды пика P2 по сравнению в данным показателем в контрольной группе ($p = 0,04$, табл. 2).

При воздействии толуола на крыс, нормальное течение эмбриогенеза которых было нарушено гипоксией (группа №2), статистически значимых изменений амплитудных показателей основных диапазонов ЭЭГ в отведениях со зрительной и сенсомоторной зон в фоновой записи по сравнению с группой контроля выявлено не было. Однако анализ результатов при проведении стимуляционных проб показал, что после интоксикации толуолом у животных, подвергавшихся внутриутробной гипоксии, наблюдались изменения показателей ЗВП и СВП. Следует отметить, что действие толуола на животных этой группы привело к более выраженному повышению некоторых показателей, по сравнению с результатами у животных с нормальным течением эмбрионального развития. Латентность пиков N1, P2, N2 и P3 как слухового, так и зрительного ответа была в 1,4–2,3 раза выше соответствующих показателей животных контрольной группы и группы крыс с нормальным течением эмбрионального развития, подвергавшихся воздействию толуола. При этом амплитуда пика N1 слухового ответа и N1 и P3 зрительного ответа значительно превышали показатели животных группы №1 «толуол» ($p < 0,05$).

Опасность развития последствий воздействия толуола на ЦНС недостаточно изучена, хотя данный токсикант широко используется на промышленных предприятиях. Согласно результатам исследований 70–80-х годов по изучению влияния толуола на изменение электроэнцефалограммы (ЭЭГ) и ритмов сна, проведенных при высоких уровнях воздействия (свыше 3750 мг/м^3) наблюдалась начальная фаза возбуждения с последующей фазой подавления активности коры головного мозга, приводящей к коме [13, 14]. При высоких уровнях воздействия (7500–15000 мг/м^3) отмечалась судорожная активность мозга. Дозозависимое влияние толуола (5300 и 4500 мг/м^3) на вызванные потенциалы и ЭЭГ выявлено Rebert с соавт. при исследовании в различных зонах коры головного мозга крыс. Авторами отмечено, что при вдыхании паров данного токсиканта отмечалось усиление высокочастотных осцилляций, особенно после вспышек света, а также возрастание мощности θ-ритма. Полученные в результате настоящего исследования данные о влиянии толуола на показатели ЭЭГ белых крыс свидетельствуют о том, что нейротоксический эффект данного соединения проявляется при относительно низких концентрациях (560 мг/м^3). При этом на последствия интоксикации оказывает влияние течение пренатального периода развития. Так, воздействие толуола на крыс с нормальным течением эмбрионального развития характеризовалось повышением индекса θ- и $\beta 1$-ритмов в фоновой записи в проекции зрительной зоны коры и отсутствием значимых изменений показателей при проведении стимуляционных проб. В то время как внутриутробная гипоксия приводила к выраженным изменениям биопотенциалов головного мозга у животных, подвергавшихся воздействию толуола, являясь при этом отягощающим фактором. Наиболее выраженные изменения показателей зафиксированы при проведении проб с применением ЗВП и СВП. Так, экспонированные крысы с нарушенным течением эмбриогенеза демонстрировали значительное увеличение латентности пиков N1, P2, N2 и P3 по сравнению с группой животных с нормальным течением эмбриогенеза, подвергавшихся воздействию толуола. Наблюдаемые изменения биоэлектрической активности могут служить подтверждением нарушений корково-подкоркового взаимодействия и, тем самым, отражать снижение когнитивных функций у животных [2, 4]. Следует отметить, что изучению ототоксичности данного соединения были посвящены многочисленные исследования. Вызванные толуолом нарушения слуха у крыс были описаны в работах Pryor (1991), Li (1992), Loquet (1999), Fechter (2007), при этом уровень воздействия токсиканта был значительным и составлял около 1500–7600 мг/м^3 [8, 9, 10, 11]. Возможно, нарушение биоэлектрической активности головного мозга крыс при регистрации слуховых вызванных потенциалов обусловлены в том числе и поражением слухового нерва при интоксикации толуолом в исследуемой дозе.

Заключение. Таким образом, выдвинутая гипотеза подтверждена результатами проведенного исследования, согласно которым чувствительность животных к действию толуола изменяется при нарушении течения их эмбрионального развития. Экспозиция толуола в исследуемой дозе (560 мг/м^3) оказала влияние на параметры компонентов слуховых и зрительных вызванных потенциалов только у особей, подвергавшихся гипоксическому воздействию в пренатальный период. Полученные результаты экспериментального моделирования свидетельствуют, что острое гипоксическое повреждение головного мозга в ранний период органогенеза (13–14-е эмбриональные сутки) является фактором, отягощающим течение интоксикации и повышающим чувствительность крыс к действию толуола.

Работа выполнена в Ангарском филиале Федерального государственного бюджетного учреждения «Восточно-Сибирский научный центр экологии человека» Сибирского отделения Российской академии медицинских наук – Научно-исследовательском институте медицины труда и экологии человека.

Таблица 1

Фоновые показатели спектральной мощности ритмических составляющих биоэлектрической активности разных зоны коры головного мозга (Me (LQ;UQ)

№ групп	Вариант исследования	Средняя амплитуда, мкВ	Характеристика диапазонов, %				
			δ	θ	α	β_1	β_2
		Сенсомоторная кора					
1	Толуол	91 (80; 112)	76(74; 82)	15 (12; 18)	5 (3; 5)	2 (1; 3)	2 (1;2,5)
2	Гипоксия + толуол	119 (79; 161)	82 (70; 88)	13 (9; 16)	3 (2; 6)	1 (1; 3)	1 (0; 3)
3	Контроль	111 (89; 124)	83 (82; 89)	12 (8; 13)	3 (2; 3)	1(0,5;1)	1(0,5;1)
		Зрительная зона					
1	Толуол	82 (69; 102)	82 (73; 87)*	11 (10;16)*	4 (2,5;6)	1(1; 3)*	1 (1; 3)
2	Гипоксия + толуол	87,5(70; 182)	86 (81; 90)	10 (7; 13)	2 (2; 3)	1 (0; 2)	1 (0; 2)
3	контроль	89 (78; 138)	88 (86; 90)	8 (7; 9)	3 (2; 3)	1(0,5;1)	1 (0; 1)

Примечания. * – различия статистически значимы по сравнению с контролем при $p < 0,05$; # – различия статистически значимы по сравнению с группой «толуол» при $p < 0,05$.

Таблица 2

Показатели слуховых и зрительных вызванных потенциалов головного мозга белых крыс (Me (LQ;UQ)

№	Варианты исследования	Характеристика диапазонов			
		N1	P2	N2	P3
		Латентность, мс / Амплитуда, мкВ			
		Слуховые вызванные потенциалы			
1	Толуол	81 (77; 83) 4 (1; 14)*	120 (113; 126) 8 (2; 26)	151 (148; 175) 18 (3; 26)	234 (212; 253) 4 (2; 25)*
2	Гипоксия + толуол	170 (134; 198)#* 20 (7; 37)#	227 (205; 261)#* 11 (4; 36)	296 (251;309)#* 16 (11; 28)	336 (313; 341)#* 21 (6; 37)
3	Контроль	72 (71; 80) 35 (8; 70)	111 (108; 119) 11 (5; 34)	151 (149; 166) 15 (11; 25)	238 (265; 257) 17 (15; 28,5)
	Зрительные вызванные потенциалы				
1	Толуол	72 (68; 83) 7 (4; 10,5)	107 (106; 116) 5 (2,5; 11)*	154 (144; 160) 5,5 (4,5; 9,5)	232 (221; 256) 8 (6; 13)
2	Гипоксия +толуол	167 (105; 202)#* 15 (10; 25)#	218 (178; 52)#* 6 (4; 17,5)	300 (238; 308)#* 8 (6; 18,5)	340 (302; 345)#* 18 (11; 30,5) #
3	Контроль	72 (68; 82) 19 (5; 34)	108 (105; 120) 17 (12,5; 23)	155 (143; 168,5) 5 (4; 16)	205 (198; 233) 19 (3,5; 31)

Примечание: над чертой – латентность (мс), под чертой – амплитуда (мкВ); * – различия статистически значимы по сравнению с контролем при $p < 0,05$; # – различия статистически значимы по сравнению с группой «толуол» при $p < 0,05$.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Власов В.Н.* Сочетанное и изолированное воздействие толуола и общей вибрации на организм // Гигиена и санитария. – 2006. – № 2 – С. 63–65.
2. *Гнездицкий В.В.* Обратная задача ЭЭГ и клиническая электроэнцефалография: Учеб. для врачей. – Таганрог: ТРТУ, 2000. – 640 с.
3. *Каримова Л.К., Бакиров А.Б., Валеева Э.Т. и др.* Смертность среди лиц трудоспособного возраста на нефтехимических производствах // Здравоохранение Российской Федерации. – 2009. – № 4. – С. 46–48.
4. *Катаманова Е.В., Якимова Н.Л., Соседова Л.М.* Значимые критерии изменений ЭЭГ при экспериментальном ртутном повреждении нервной системы // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2010. – № 4 (74). – С. 32–36.
5. *Пальчик А.Б. Шабанов Н.П.* Гипоксически-ишемическая энцефалопатия новорожденных: Руководство для врачей. – СПб.: «Питер», 2000. – 140 с.
6. *Тимашева Г.В., Валеева О.В.* Диагностическая значимость биохимических и гематологических изменений у работников нефтехимической промышленности // Медицина труда и промышленная экология. – 2009. – № 11. – С. 20–23.
7. *Cannon T., van Erg T., Rosso I. et al.* Fetal hypoxia and structural brain abnormalities in schizophrenic patients, their siblings, and controls // Arch. Gen. Psychiatry. – 2002. – Vol. 59, № 1. – P. 35–41.
8. *Fechter L. D., Gearhart C., Fulton S. et al.* Promotion of Noise-Induced Cochlear Injury by Toluene and Ethylbenzene in the Rat // Toxicol. Sci. – 2007. – Vol. 98, № 2. – P. 542–551.
9. *Li H.S., Johnson A.C., Borg E., Höglund G.* Auditory degeneration after exposure to toluene in two genotypes of mice // Arch Toxicol. – 1992. – Vol. 66, № 6. – P. 382–388.
10. *Loquet G., Campo P., Lataye R.* Comparison of toluene-induced and styrene-induced hearing losses // Neurotox. Teratol. – 1999. – Vol. 21, № 6. – P. 689–697.
11. *Pryor G., Rebert C.., Kassay. K et al.* The hearing loss associated with exposure to toluene is not caused by a metabolite // Brain Res. Bull. 1991. – Vol. 27. – P. 109–113.
12. *Raxinos G., Watson C.* The rat brain in stereotaxic coordinates. – Sydney, 1982. – 480 p.
13. *Rebert Ch.S., Matteucci M.J., Pryor G.T.* Acute electrophysiologic effects of inhaled toluene on adult male Long-Evans rats // Pharmacol. Biochem. and Behavior. – 1989. – Vol. 33. – P. 157–165.
14. *Takeuchi Y., Hisanaga N.* The neurotoxicity of toluene: EEG changes in rats exposed to various concentrations // Brit. J. Indus. Med. – 1977. Vol. 34. – P. 314–324.

V.A. Vokina, L.M. Sosedova, E.V. Katamanova, V.S. Rukavishnikov, O.M. Ghurba

Impact of prenatal hypoxia on the character of toluene neurotoxic effects in rats

Research Institute of Occupational Medicine and Human Ecology, Angarsk Branch of the East-Siberian Research Center for Human Ecology, Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, 665826, Angarsk, Russian Federation

Changes in bioelectrical activity of the cerebral cortex of albino rats following inhalation exposure to toluene were examined. Specific features of EEG disturbances in the cerebral cortex in animals with normal and abnormal embryonic development were established. It was shown that acute hypoxia at the early stages of organogenesis (gestation days 13-14) leads to significant changes in the brain biopotentials in toluene-exposed mature rats and presents an aggravating factor. It appears that this effect is associated with imbalance of excitation and inhibition processes in subcortical neurons in the rat visual cortex.

Key words: *electroencephalography (EEG), prenatal hypoxia, toluene, white rats*

Материал поступил в редакцию 09.11.2012 г.

УДК: 615.9 [567.242]: 591.111.1

Цитохимическая оценка влияния этанола на активность ферментов в лейкоцитах крыс

М.В. Долгушин,
Н.А. Малышкина,
Г.Г. Юшков

НИИ биофизики ФГБОУ ВПО Ангарской государственной технической академии Министерства образования и науки РФ, 665830, Иркутская обл., г. Ангарск

Изучали динамику активности ферментов в лейкоцитах крови при воздействии 30 % водного раствора этанола, который вводили животным перорально в течение четырех недель, в ежедневной дозе 3 г/кг. Метаболические сдвиги, включающие ингибирование миелопероксидазы и активацию кислой фосфатазы в нейтрофилах, угнетение эстеразы в нейтрофилах и лимфоцитах, проявлялись в виде стабильной реакции на алкоголь, тогда как изменения активности дегидрогеназ в лимфоцитах и щелочной фосфатазы в нейтрофилах имели фазовый характер, показывая зависимость от продолжительности экспозиции.

Ключевые слова: *этанол; токсические эффекты; лейкоциты; ферменты; цитохимия*

Введение. Потребление алкоголя оказывает существенный ингибирующий эффект на функциональный статус лимфоцитов и нейтрофилов, что, очевидно, связано со способностью этилового спирта и его метаболитов индуцировать нарушения иммунных и неспецифических реакций организма [5, 12, 16–18]. В этом смысле следует признать актуальной оценку характера обменных процессов в лейкоцитах крови в рамках исследования механизмов интоксикации этанолом.

Цитоэнзимохимический анализ нейтрофилов и лимфоцитов позволяет выявить диагностически значимые признаки отравления этиловым спиртом, которые могут быть использованы как в клинике (при алкогольной болезни), так и в эксперименте [1, 9, 13]. В настоящей работе *была поставлена цель*: изучить направленность изменений в цитохимических показателях активности ферментов у животных, подвергнутых многократному воздействию этанола в относительно низкой дозе. При этом предполагалось рассмотреть динамические особенности ранней клеточно-метаболической реакции на алкоголь, учитывая возможные различия в зависимости ферментативных сдвигов от продолжительности экспозиции.

Материалы и методы исследования. Для исследования были взяты белые неинбредные крысы-самцы массой 170–230 г, схема опыта и условия содержания крыс соответствовали «Правилам лабораторной практики» (Приказ Минздравсоцразвития РФ от 26 августа 2010 г. №708н). Все животные были разделены на две группы (контрольную и опытную), по 10 особей в каждой. Животным из опытной группы ежедневно в течение четырёх недель перорально вводили 30%-ный водный раствор этанола в дозе 3 г/кг. Воздействующая концентрация алкоголя была выбрана как средняя (варьирующая в крепких спиртных напитках примерно от 20 до 40%). Животным из контрольной группы вводили дистиллированную воду. Забор крови для снятия показателей проводили через 7, 14 и 28 дней после начала введения вещества. Из взятых образцов крови готовили мазки, которые были использованы для цитохимического анализа активности миелопероксидазы (МП), щелочной фосфатазы (ЩФ) и кислой фосфатазы (КФ) в нейтрофилах, сукцинатдегидрогеназы (СДГ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и α-глицерофосфатдегидрогеназы (ГФДГ) в лимфоцитах, неспецифической нафтол-AS-ацетатэстеразы (НЭ) в нейтрофилах и лимфоцитах. Реакцию на МП выявляли бензидиновым методом [10], на дегидрогеназы – методом Р.П. Нарциссова [8], на ЩФ и КФ – методом азосочетания по Берстону [14], на НЭ – методом азосочетания по Леффлеру [7]. Результаты определения активности дегидрогеназ и НЭ в лимфоцитах выражали в среднем числе гранул продукта реакции на клетку, а уровень активности МП, ЩФ и НЭ в нейтрофилах и КФ в нейтрофилах и лимфоцитах – в условных единицах среднего цитохимического коэффициента по L. Kaplow [7]. Статистическую достоверность выявленных метаболических сдвигов у животных опытной группы по отношению к контролю оценивали при помощи U-критерия (Манна-Уитни).

Результаты и обсуждение. Изменения в ферментативном статусе ней-

Долгушин Максим Валерьевич (Dolgushin Maxim Valerievich), канд. биол. наук, старший научный сотрудник отдела токсикологии НИИ биофизики ФГБОУ ВПО Ангарской государственной технической академии Министерства образования и науки РФ maxdolg2008@yandex.ru
Малышкина Наталья Александровна (Malyshkina Natalia Aleksandroyna), мл. научн. сотр. отдела токсикологии НИИ биофизики ФГБОУ ВПО Ангарской государственной технической академии Министерства образования и науки РФ
Юшков Геннадий Георгиевич(Yushkov Gennady Georgievich), канд. мед. наук, зав. отделом токсикологии НИИ биофизики ФГБОУ ВПО Ангарской государственной технической академии Министерства образования и науки РФ

Таблица 1

Изменение активности ферментов в лимфоцитах крыс при воздействии этанола

Продолжительность воздействия	Группа	МП	ЩФ	НЭ	КФ
7 дней	Контрольная Опытная	1,20 ± 0,03 1,04 ± 0,02*	2,18 ± 0,14 1,63 ± 0,05*	1,43 ± 0,04 1,27 ± 0,03*	0,39 ± 0,03 0,59 ± 0,03*
14 дней	Контрольная Опытная	1,23 ± 0,04 1,08 ± 0,02*	1,95 ± 0,05 2,44 ± 0,02*	1,35 ± 0,04 1,02 ± 0,04*	0,44 ± 0,04 1,01 ± 0,05*
28 дней	Контрольная Опытная	1,25 ± 0,03 1,13 ± 0,02*	2,11 ± 0,06 2,53 ± 0,25	1,32 ± 0,03 1,10 ± 0,03*	0,37 ± 0,02 0,73 ± 0,04*

Примечания. Показана достоверность отличия полученных данных в опытной группе по отношению к контролю: *– $p < 0,01$.
МП – миелопероксидаза, ЩФ – щелочная фосфатаза, НЭ – неспецифическая нафтол-AS-ацетатэстераза, КФ – кислая фосфатаза.
Все показатели выражены в условных единицах среднего цитохимического коэффициента.

трофилов и лимфоцитов под влиянием этанола были отмечены на всех этапах обследования (табл. 1, 2). В динамике клеточно-метаболической реакции на алкоголь сдвиги в активности МП и КФ нейтрофилов, НЭ нейтрофилов и лимфоцитов имели стабильный характер, проявляясь одинаково (в виде угнетения МП и НЭ при сопутствующей стимуляции КФ) вне связи с периодом экспозиции. Значения цитохимических показателей на дегидрогеназы в лимфоцитах и на ЩФ в нейтрофилах в ходе интоксикации, напротив, обнаруживали фазовые изменения, зависящие от продолжительности введения вещества. При этом в лимфоцитах в течение первых двух недель наблюдалась активация митохондриальных ферментов (СДГ и ГФДГ) с параллельным снижением уровня ЛДГ. В дальнейшем, на завершающем этапе эксперимента, отмечалось ингибирование СДГ при отсутствии каких-либо изменений в активности дегидрогеназ лактата и α-глицерофосфата. В то же время активность ЩФ после воздействия алкоголя в течение одной недели снижалась, а ещё через неделю – возрастала. К моменту завершения эксперимента интенсивность реакции на ЩФ у опытных животных в среднем достоверно не отличалась от контроля (табл. 1). Вместе с тем, высокая степень варьирования в значениях активности ЩФ у особей опытной группы (и соответственно повышение стандартной ошибки) могла свидетельствовать о различной направленности сдвигов в уровне данного фермента по отношению к животным из группы контроля. Действительно, результаты индивидуального анализа свидетельствовали о том, что у каждого отдельного животного, входившего в опытную группу, активность ЩФ была либо выше значений в контроле (то есть продолжала находиться в состоянии стимуляции, составляя в среднем 3,11 ± 0,11; $n = 6$; $p < 0,01$), либо ниже показателей в контроле (составляя в среднем 1,65 ± 0,06; $n = 4$, $p < 0,01$), претерпевая в этом случае период вторичного угнетения.

Основные общетоксические эффекты этанола обусловлены его биотрансформацией до ацетальдегида и ацетата, при этом ведущую роль в интоксикации играет именно ацетальдегид, способный оказывать выраженное цитотоксическое действие, связываясь с каталитическими центрами ферментов, а также принимая косвенное участие в индукции окислительного стресса [4, 6]. Установлено, что один из признаков последнего – повышение уровня первичных продуктов свободнорадикального окисления в периферической крови – сопровождается снижением активности МП при параллельной стимуляции КФ в нейтрофилах и угнетением СДГ в лимфоцитах [2, 3]. Данный разнонаправленный сдвиг в активности МП и КФ нейтрофилов, зафиксированный нами в качестве стабильной реакции, отмечался при воздействии алкоголя и ранее, в ходе однократной оценки его острых и хронических эффектов [13]. Кроме того, ингибирование СДГ также было отнесено к числу неблагоприятных последствий продолжительного влияния этанола, обнаруживаясь при обследовании больных хроническим алкоголизмом [1]. В нашем опыте снижение уровня лимфоцитарной СДГ было связано с тяжестью интоксикации аналогичным образом (проявляясь лишь при завершении воздействия), очевидно, отражая тем самым кумулятивный эффект этилового спирта и особенности физиологического статуса лимфоцитов, более устойчивых к окислительному стрессу, чем нейтрофилы [15].

Метаболический сдвиг противоположной направленности (повышение уровня СДГ), обнаруженный нами на более ранних этапах развития реакции на алкоголь, возможно, был обусловлен увеличенным влиянием ацетата, предшественника ацетилкофермента А. В свою очередь активация окисления сукцината сопровождалась снижением интенсивности гликолиза (на что указывало уменьшение уровня ЛДГ), тогда как возрастание уровня ГФДГ можно рассматривать как проявление усиленной работы α-глицерофосфатного шунта, направленной на поддержание окислительно-восстановительного потенциала в клетке [6]. Вполне вероятно, что выявленное в настоящей работе устойчивое снижение активности НЭ в нейтрофилах и лимфоцитах также связано с ответом на избыток ацетата, который, очевидно, оказывал ингибирующий эффект по типу отрицательной обратной связи.

Анализируя особенности реагирования ещё одного определяемого нами параметра, ЩФ нейтрофилов, следует отметить, что представленные в литературе результаты цитохимической оценки уровня данного фермента при алкогольной интоксикации не были одинаковыми, демонстрируя либо его угнетение (в условиях эксперимента, у белых крыс) [13], либо активацию (в условиях клиники, при алкогольной болезни) [9]. При этом обнаруженный нами фазовый характер реакции на ЩФ, отражающий зависимость реализации вышеуказанных разнонаправленных ферментативных сдвигов от продолжительности влияния алкоголя и от индивидуальной чувствительности, может быть связан с изменениями в состоянии эндокринной регуляции. Известна способность этанола при длительном введении активировать стрессовые механизмы, индуцируя высвобождение гормонов из гипофиза и коры надпочечников [6], в частности, в крови белых крыс в ходе подобной имитации стресс-реакции происходит увеличение концентрации кортикостерона [5]. Модификация активности ЩФ в нейтрофилах под действием глюкокортикоидов проявляется достаточно отчетливо и может иметь различные тенденции, как в сторону возрастания, так и снижения, вероятно, в связи с влиянием на ферментативную индукцию и на проницаемость внутриклеточных мембран [11, 14].

Заключение. Таким образом, цитохимический анализ активности окислительных и гидролитических ферментов в лейкоцитах крови в динамике умеренного потребления этанола позволил выявить специфику в реализации ранних признаков интоксикации. Ферментативные сдвиги, включающие ингибирование миелопероксидазы и активацию кислой фосфатазы в нейтрофилах, угнетение эстеразы в нейтрофилах и лимфоцитах, проявлялись в виде стабильной реакции на алкоголь, тогда как изменения активности дегидрогеназ в лимфоцитах и щелочной фосфатазы в нейтрофилах имели фазовый характер, показывая зависимость от продолжительности воздействия. При этом оценка метаболических процессов, отражающих динамику интоксикации, дала возможность зафиксировать особенности внутриклеточного ответа, связанные с начальным проявлением кумулятивного эффекта (угнетение сукцинатдегидрогеназы), а также с индивидуальной чувствительностью к воздействию этанола (разнонаправленное изменение активности щелочной фосфатазы при одинаковой продолжительности экспозиции).

Таблица 2

Изменение активности ферментов в нейтрофилах крыс при воздействии этанола

Продолжительность воздействия	Группа	СДГ	ЛДГ	ГФДГ	НЭ
7 дней	Контрольная Опытная	13,4 ± 0,5 17,6 ± 0,4*	18,4 ± 0,3 11,7 ± 0,3*	10,3 ± 0,3 13,5 ± 0,4*	11,3 ± 0,4 8,3 ± 0,5*
14 дней	Контрольная Опытная	14,1 ± 0,2 18,0 ± 0,5*	19,5 ± 0,9 13,1 ± 0,8*	11,3 ± 0,5 15,5 ± 0,8*	10,9 ± 0,4 6,8 ± 0,5*
28 дней	Контрольная Опытная	14,7 ± 0,4 11,7 ± 0,3*	19,9 ± 0,8 18,2 ± 1,1	11,2 ± 0,7 10,5 ± 0,5	10,0 ± 0,4 5,7 ± 0,2*

Примечания. Показана достоверность отличия полученных данных в опытной группе по отношению к контролю: * – $p < 0,01$.

СДГ – сукцинатдегидрогеназа, ЛДГ – лактатдегидрогеназа , ГФДГ – митохондриальная α-глицерофосфатдегидрогеназа, НЭ – неспецифическая нафтол-AS-ацетатэстераза. Все показатели выражены в среднем числе гранул продукта реакции на клетку.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Альбрандт А.И., Кадричева С.Г., Савченко А.А., Смолина Е.В.* Морфоденситометрическая оценка ферментативного статуса лимфоцитов при исследовании патогенеза хронического алкоголизма // Клин. лаб. диагност., 2000. – № 12. – С. 35–39.
2. *Власова М.Е., Березовская И.В., Гукасов В.М.* Роль перекисного окисления липидов плазмы и ферментного спектра лейкоцитов крови в оценке предпатологии химической этиологии // Хим.-фарм. журнал, 1983. – Т. 17 (12). – С. 1432–1436.
3. *Власова М.Е., Березовская И.В., Петрова Л.И.* Ферментный спектр лейкоцитов и кинетика продуктов перекисного окисления липидов как критерий тяжести интоксикации // Лаб. Дело, 1985. – № 12. – С. 713–716.
4. *Долго-Сабуров В.Б., Петров А.Н., Беляев В.А.* О роли окислительного стресса в формировании цитотоксических эффектов этанола // Токсикол. вестник, 2010. – № 1. – С. 6–10.
5. *Забродский П.Ф., Свистунов А.А., Лим В.Г. и др.* Фармакологическая коррекция активности Th1- и Th2-лимфоцитов и цитокинового профиля при интоксикации этанолом // Эксперимент. и клин. фармакол., 2010. – Т. 73 (11). – С. 19–21.
6. *Зезеров Е.Г.* Алкоголизм. Элементы патобиохимии и патофизиологии // Патологическая физиология и биохимия. – М.: Экзамен, 2005. – С. 303–325.
7. Лабораторные методы исследования в клинике / Под ред. В.В. Меньшикова. – М.: Медицина, 1987. – 368 с.
8. *Мишин В.Ю.* Медикаментозные осложнения комбинированной химиотерапии туберкулёза лёгких. – М.: МИА, 2007. – 248 с.
9. *Морозов Ю.Е.* Морфологические изменения крови при хронической интоксикации алкоголем // Современные вопросы судебной медицины и экспертной практики. Вып. 10. – Ижевск: Экспертиза, 1998. – С. 288–289.
10. Морфологические и цитохимические исследования крови для выявления ранних признаков вредного влияния химических веществ на организм: Методические рекомендации. – М., 1982. – 17 с.
11. *Панин Л.Е., Маянская Н.Н.* Лизосомы. Роль в адаптации и восстановлении. – Новосибирск: Наука, 1987. – 200 с.
12. *Свистунов А.А., Забродский П.Ф., Лим В.Г., Гришин В.А.* Изменение функции Th1- и Th2-лимфоцитов и цитокинового профиля при хронической интоксикации этанолом // Саратовский мед. журнал, 2010. – Т. 6 (2). – С. 307–309.
13. *Тухтаев К.Р., Зуфаров А.К., Юсупов Ф.Н.* Цитологические и цитохимические изменения элементов гемопоэза при острой и хронической интоксикации алкоголем // Общие механизмы клеточных реакций на повреждающие воздействия. – Л.: Наука, 1977. – С. 170–171.
14. *Хейхоу Ф.Г.Дж., Квaглино Д.* Гематологическая цитохимия. – М.: Медицина, 1983. – 320 с.
15. *Bechoua S., Dubous M., Domingues Z. et al.* Protective effect of decosahexaenomic acid against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in human lymphocytes // Biochem. Pharmacol., 1999. – V. 57 (9). – P. 1021–1030.
16. *Helm R.M., Wheeler G., Burks A.W. et al.* Flow cytometric analysis of lymphocytes from rats following chronic ethanol treatment // Alcohol, 1996. – V. 13 (5). – P. 467–471.
17. *Patel M., Keshavarzian A., Kottapalli V. et al.* Human neutrophil functions are inhibited in vitro by clinically relevant ethanol concentrations // Alcogol Clin. Exp. Res., 1996. – Vol. 20 (2). – P. 275–283.
18. *Vrsalovic M., Vrsalovic M.M., Presecki A.V., Lukac J.* Modulating role of alcohol and acetaldehyde on neutrophil and monocyte functions in vitro // J. Cardiovasc. Pharmacol., 2007. – Vol. 50 (4). – P. 462.

M.V. Dolgushin, N.A. Malyshkina, G.G.Yushkov

Cytochemical evaluation of ethanol influence on enzymes activity in rat leucocytes

Institute of Biophysics, Angarsk State Technical Academy, 665830, Angarsk, Irkutsk Region, Russian Federation

The dynamics of enzymes activity in blood leucocytes was studied at exposure to a 30% solution of ethanol which was perorally administrated to animals over 4 weeks in a daily dose of 3 g/kg. Metabolic shifts including the inhibition of myeloperoxidaze and activation of acidic phosphatase in neutrophils, inhibition of esterase in neutrophils and lymphocytes appeared as a stable response to alcohol, while changes in the dehydrogenase activity in lymphocytes and alcaline phosphatase in neutrophils had a phase character revealing the dependence on exposure duration.

Key words: *cytochemistry, enzymes, ethanol, leukocytes, toxic effects*

Материал поступил в редакцию 01.08.2012 г.

УДК 615.9

Лонтерр, ВДГ

Е.А. Карпухина, С.В. Каютина, Н.В. Хорошилова, Т.А. Ткачева

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт медицины труда» Российской академии медицинских наук (ФГБУ «НИИ МТ» РАМН), 105275, г. Москва

Оценены опасные свойства пестицида «Лонтерр, ВДГ»

***Ключевые слова**: опасность, пестициды*

Препаративная форма: водно-диспергируемые гранулы. В качестве действующего вещества (ДВ) в препарате использован клопиралид (3,6-дихлорпиколиновая кислота), синоним лонтрел, стингер), $C_6H_3Cl_2NO_2$, CAS [1702-17-6], шифр CIPAC (Международного совместного аналитического совета по пестицидам) 455. Содержание действующего вещества – 750 г/кг. Представляет собой порошок белого цвета, хорошо растворимый в воде. Применяется в сельском хозяйстве в качестве гербицида.

Оценка токсичности и опасности проводилась на инбредных лабораторных животных питомника РАМН «Андреевка» согласно отечественной нормативной документации – «Правилам лабораторной практики» (Приказ Минздравсоцразвития РФ от 26 августа 2010 г. №708н). DL_{50} для мышей-самок при введении в желудок 6250 ± 266 мг/кг, для крыс-самок – 6500 ± 283 мг/кг, что характеризует вещество как малоопасное (IV класс опасности по классификации ГОСТ 12.1.007-76).

Клиническая картина отравления характеризуется адинамией, затрудненностью дыхания, сукровичными выделениями из носа. Гибель животных наступала в течение первых трех суток.

При однократном ингаляционном воздействии (в насыщающих концентрациях при 20 °С) гибели мышей и видимых клинических признаков интоксикации не наблюдалось.

CL_{50} не достигнута.

Продукт обладает слабым кожно-раздражающим действием в острых опытах на кроликах и мышах (легкая гиперемия, проходящая в течение 2 часов после экспозиции) и умеренно раздражающим действием при повторном воздействии (умеренная гиперемия, слабый отек, сохраняющиеся до окончания эксперимента).

При нанесении на слизистые оболочки глаз кроликов в нативном виде вызывает умеренное раздражающее действие (слезотечение, гиперемию конъюнктивы, отек век).

Кожно-резорбтивное действие продукта в острых и повторных опытах на кроликах и мышах не выявлено. У мышей при повторном воздействии наблюдалась ригидность хвостов.

Эксперимент по оценке сенсибилизирующих свойств препарата Лонтерр, ВДГ проводили на морских свинках комбинированным методом (однократная внутрикожная инъекция с последующими повторными эпикутанными аппликациями). Результаты экспериментального исследования показали, что препарат Лонтерр, ВДГ в нативном виде вызывает положительные реакции на кожные разрешающие пробы у 37,5% подопытных животных. В реакциях клеток крови на исследуемое вещество in vitro установлено 50% положительных реакций, причем средне групповые величины показателей РСЛЛ и РСАЛ статистически достоверно отличались от контроля. Проведенное исследование не выявило изменений в лейкоцитарной формуле подопытных животных по сравнению с контрольными.

Принимая во внимание наличие признаков сенсибилизирующего действия животных по кожным пробам, при статистически достоверном увеличении показателей РСЛЛ и РСАЛ, препарат Лонтерр, ВДГ по сенсибилизирующему действию можно отнести к 3-му классу подклассу А умеренных аллергенов (Гигиеническая классификация пестицидов по степени опасности. Методические рекомендации №2001/26)

Ye.A.Karpukhina, S.V.Kayutina,
N.V. Khoroshilova, T.A. Tkacheva

Pesticide formulation «Lonterr ВДГ»

Institute of Occupational Health, Russian Academy of Medical Sciences, 105275, Moscow, Russian Federation

Hazardous properties of the pesticide Lonterr ВДГ are examined.

***Key words:** hazard, pesticides*

Карпухина Елена Александровна (Karpukhina Elena Aleksandrovna), лаборатория токсикологии ФГБУ «НИИ МТ» РАМН, niimt@niimt.ru
Каютина Светлана Владимировна (Kayutina Svetlana Vladimirovna), лаборатория токсикологии ФГБУ «НИИ МТ» РАМН, niimt@niimt.ru
Хорошилова Нина Васильевна(Khoroshilova Nina Vasilievna), лаборатория токсикологии ФГБУ «НИИ МТ» РАМН, niimt@niimt.ru
Ткачева Татьяна Анатольевна (Tkacheva Tatiana Anatolievna), д.м.н., зав. лабораторией токсикологии ФГБУ «НИИ МТ» РАМН, niimt@niimt.ru

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
21.	ETHACURE® 90 Отвердитель (ETHACURE® 90 Curative)	«Albemarle Europa SPRL», Parc Scientifique Einstein, Rue du Bosquet, 9, B-1348, Louvain-la-Neuve, Belgium (Бельгия)	«Albemarle Europa SPRL», Parc Scientifique Einstein, Rue du Bosquet, 9, B-1348, Louvain-la-Neuve, Belgium (Бельгия)	RU.77.99.88.008.E.005769.03.12 от 27.03.2012	N,N`-Бис(1,2,2-триметилпропил)гексан-1,6-диамин	957787-76-7/	N,N`-Бис(1,2,2-триметилпропил)гексаметилен-диамин	серия ВТ № 003672
22.	Tinuvin® PA 144	«BASF SE», D-67056 Ludwigshafen, Carl-Bosch Str., 38, Германия; производственные филиалы	ЗАО «БАСФ», 119017, г. Москва, Кадашевская наб., д. 14, к. 3 (Российская Федерация)	RU.77.99.34.008.E.005738.03.12 от 27.03.2012	Бис(1,2,2,6,6-пентаметил-4-пиперидинил) [[3,5-бис(1,1-диметилэтил)-4-гидроксифенил]метил]бутилпропандиоат	63843-89-0/ 264-513-3	Бис(1,2,2,6,6-пентаметил-4-пиперидил) [[3,5-бис(1,1-диметилэтил)-4-гидроксифенил] метил]бутилмалонат	серия ВТ № 003473
23.	Aminotri (methylenephosphonic acid) 95% / Аминотри (метиленфосфоновая) кислота 95%	KCC INDUSTRIAL ENTERPRISE LIMITED, RM2219, ZHONGYI MANSION, NO.1040, CAOYANG ROAD, SHANGHAI, CHINA (Китайская Народная Республика)	ООО «РОСТХИМЭКСПОРТ», 193230, Россия, Санкт-Петебург, Октябрьская наб., 44 (Российская Федерация)	RU.77.99.32.008.E.005736.03.12 от 27.03.2012	[Нитрилотрис (метилен)] трисфосфоновая кислота	6419-19-8/ 229-146-5	Трис (метилфосфоно) амин, нитрилотриметилен- трис(фосфоновая кислота), кислота НТФ, аминотриметилфосфоновая кислота, аминотриметиленфосфоновая кислота (ATMP), аминотриметанфосфоновая кислота, нитрилотриметанфосфоновая кислота, нитрилотриметиленфосфоновая кислота, нитрилотриметилфосфоновая кислота (НТФ), ATMP 95%	серия ВТ № 001339
24.	2-Этилгексил нитрат	«EURENCO», 33, rue Joubert 75009 Paris, Франция (адрес производства: Etablissement de SORGUES, 1928, avenue d'Avignon CS 90109 SORGUES-84275 VEDENE CEDEX) (Франция)	ООО «Лукейтер», 109391, г. Москва, 2-й Карачаровский пр-д, д. 4А (Российская Федерация)	RU.77.99.27.008.E.005722.03.12 от 26.03.2012	2-Этилгексилнитрат	27247-96-7/ 248-363-6	2-Этилгексиловый эфир азотной кислоты	серия ВТ № 003367
25.	LAUROX	«Akzo Nobel Polymer Chemicals B.V.», Stationsstraat 77, PO Box 247, NL-3800 AE Amersfoort (Нидерланды)	ООО «Акзо Нобель», 125445, г. Москва, ул. Смольная, д. 24 Д, этаж 4, комн. 16 (Российская Федерация)	RU.77.99.27.008.E.005721.03.12 от 26.03.2012	Бис(1-оксододецил) пероксид	105-74-8/ 203-326-3	Дилауроилпероксид; дидодеканоилпероксид; перекись лауроила; дилаурилпероксид; лауроил пероксид	серия ВТ № 001894
26.	Tetrahydrofuran/ Тетрагидрофуран	«POCH Spolka Akcyjna», 44-101 Gliwice, Sovinskiego 11 st (Польша)	ООО «ТПК «Химтехимпорт», 125480, г. Москва, ул. Виліса Лациса, д. 7, корп. 4, оф. 1 (Российская Федерация)	RU.77.99.88.008.E.005674.03.12 от 22.03.2012	Тетрагидрофуран	109-99-9/ 203-726-8	Окись тетраметилена, окись диэтилена, тетраметиленоксид, диэтиленоксид, фуранидин, 1,4-эпоксибутан, оксациклопентан, оксалан	серия ВТ № 000332
27.	HEUCODUR-Geld 3R; HEUCODUR-Geld 6R	«Heubach Gmbh», Heubachstrasse 7, 38685 Langelsheim (Германия)	ЗАО «БАЙЕР», 123022, г. Москва, Большой Трехгорный пер.,1, стр. 1 (Российская Федерация)	RU.77.99.88.008.E.005673.03.12 от 22.03.2012	Сурьма хром титан диоксид	68186-90-3/ 269-052-1	Рутил системы сурьма-хром (III)-титан оксид; сурьма хлор рутил системы; сурьма хром титанат желтый	серия ВТ № 000967
28.	Метилтетрагидрофталевый ангидрид (MTHPA)	«Hangzhou Foreign Economic Relations and Trade Service Co.», Ltd 16th Floor Huazhe Building, No.1 Huazhe Plaza, Hangzhou, China (Китайская Народная Республика)	«Hangzhou Foreign Economic Relations and Trade Service Co.», Ltd 16th Floor Huazhe Building, No.1 Huazhe Plaza, Hangzhou, China (Китайская Народная Республика)	RU.77.99.32.008.E.005598.03.12 от 21.03.2012	Тетрагидрометилизобензофуран-1,3-дион	11070-44-3/ 234-290-7	Тетрагидрометилфталевый ангидрид; Methyltetrahydrophthalic Anhydride	серия ВТ № 003457

№ п/п	Наименование продукта	Производитель	Получатель	Номер свидетельства о госрегистрации, дата регистрации	Наименование вещества по IUPAC	№ CAS/ ЕС	Синонимы, торговые и фирменные названия	Номер РПОХБВ
29.	Аэрофлот натриево-бутиловый / Sodium Butyl Aerofloat	«China Corporation Group Limited», 3rd Floor Jonsim Place, 228 Queen's Road East, Wanchai, Hong Kong (Китайская Народная Республика)	Представительство Компании с ограниченной ответственностью «Чайна Корпорейшн Груп Лимитед» (Китай, Гонконг) г.Москва 109052, г.Москва, ул.Нижегородская, д.104, корп.3, пом.1, комн.3. (Российская Федерация)	RU.77.99.32.008.E.005597.03.12 от 21.03.2012	О-Бутилдитиокарбонат натрия	141-33-3/ 205-481-2	О-Бутиловый эфир дитиоугольной кислоты натриевая соль; О-бутилксантогенат натрия; бутиловый ксантогенат натрия; ксантогенат натрия бутилового	серия ВТ № 002008
30.	Ферроцен (Ferrocene)	Beijing Jinhao Century International Trading Co., Ltd Room 804, Block 3, SOHO Modern City, No. 88 Jianguo Road, Chaoyang District Beijing, China (Китайская Народная Республика)	ООО «Орсэк», 344092, г. Ростов-на-Дону, пр. Космонавтов, д. 17/3 (Российская Федерация)	RU.77.99.32.008.E.005596.03.12 от 21.03.2012	Дициклопента-2,4-диен-1-ил железо	102-54-5/ 203-039-3	Бисциклопентадиенил железо; ди-2,4-циклопентадиен-1-ил железо; дициклопентадиенил железо; бис(пи-циклопентадиенил) железо; Ферроцен	серия ВТ № 001341
31.	N-Метиланилин (N-Methylaniline)	Beijing Jinhao Century International Trading Co., Ltd Room 804, Block 3, SOHO Modern City, No. 88 Jianguo Road, Chaoyang District Beijing, China (Китайская Народная Республика)	ООО «Орсэк», 344092, г. Ростов-на-Дону, пр. Космонавтов, д. 17/3 (Российская Федерация)	RU.77.99.32.008.E.005595.03.12 от 21.03.2012	N-Метиланилин	100-61-8/ 202-870-9	N-Монометиланилин; N-метилфениламин; N-фенилметиламин; N-метилбензоламин; (метиламино) бензол	серия ВТ № 000081
32.	Ксантогенат калия бутиловый «РВХ»	China Corporation Group Limited, 3rd Floor, Jonsim Place 228 Queen's Road East, Wanchai, Hong Kong (Китайская Народная Республика)	Представительство Компании с ограниченной ответственностью «Чайна Корпорейшн Груп Лимитед» (Китай, Гонконг) г. Москва. 109052, г. Москва, ул. Нижегородская, д. 104, корп. 3, пом. 1, комн. 3 (Российская Федерация)	RU.77.99.32.008.E.005594.03.12 от 21.03.2012	О-Бутилдитиокарбонат калия	871-58-9/ 212-808-2	О-Бутилксантогенат калия; бутилксанто-геновокислый калий; О-бутиловый эфир дитиоугольной кислоты калиевая соль	серия ВТ № 000691
33.	Тиомочевина/ THIOUREA	China Corporation Group Limited, 3rd Floor, Jonsim Place 228 Queen's Road East, Wanchai, Hong Kong (Китайская Народная Республика)	Представительство Компании с ограниченной ответственностью «Чайна Корпорейшн Груп Лимитед» (Китай, Гонконг) г. Москва. 109052, г. Москва, ул. Нижегородская, д. 104, корп. 3, пом. 1, комн. 3 (Российская Федерация)	RU.77.99.32.008.E.005593.03.12 от 21.03.2012	Тиокарбамид	62-56-6/ 200-543-5	Диамид тиоугольной кислоты	серия ВТ № 000642
34.	Flamestab® NOR 116 FF	«BASF SE», D-67056 Ludwigshafen, Carl-Bosch Str., 38, Германия; производственный филиал: BASF US, 1379 Ciba Road, McIntosh, Alabama 36553, USA (США)	ЗАО «БАСФ», 119017, г. Москва, Кадашевская наб., д. 14, к. 3 (Российская Федерация)	RU.77.99.34.008.E.005570.03.12 от 21.03.2012	Продукт реакции N1,N1'-1,2-этандиилбиспропан-1,3-диамина с продуктом реакции циклогексана с пероксидом N-бутил-2,2,6,6-тетраметил-4-пиперидинамин-2,4,6-трихлор-1,3,5-триазином	191680-81-6/ 425-020-0		серия ВТ № 003657
35.	Irganox® 565, Irganox® 565 DD	«BASF SE», D-67056 Ludwigshafen, Carl-Bosch Str., 38, Германия; производственный филиал	ЗАО «БАСФ», 119017, г. Москва, Кадашевская наб., д. 14, к. 3 (Российская Федерация)	RU.77.99.34.008.E.005569.03.12 от 21.03.2012	4-[[4,6-Бис(октилтио)-1,3,5-триазин-2-ил]амино]-2,6-бис(1,1-диметилэтил)фенол	991-84-4/ 213-590-1	2,6-Ди-трет-бутил-4-(4,6-бис(октилтио)-(1,3,5-триазин-2-ил)амино)фенол	серия ВТ № 003659
36.	Tinuvin® 234, Tinuvin® 234 FF	BASF SE», D-67056 Ludwigshafen, Carl-Bosch Str., 38, Германия; производственные филиалы	ЗАО «БАСФ», 119017, г. Москва, Кадашевская наб., д. 14, к. 3 (Российская Федерация)	RU.77.99.34.008.E.005568.03.12 от 21.03.2012	2-(2H-Бензотриазол-2-ил)-4,6-бис(1-метил-1-фенилэтил) фенол	70321-86-7/ 274-570-6	Тинувин 234	серия ВТ № 003286

№ п/п	Наименование продукта	Производитель	Получатель	Номер свидетельства о госрегистрации, дата регистрации	Наименование вещества по IUPAC	№ CAS/EC	Синонимы, торговые и фирменные названия	Номер РПО-ХБВ
37.	Tinuvin® 326, Tinuvin® 326FL	BASF SE», D-67056 Ludwigshafen, Carl-Bosch Str., 38, Германия; производственные филиалы	ЗАО «БАСФ», 119017, г. Москва, Кадашевская наб., д. 14, к. 3 (Российская Федерация)	RU.77.99.34.008. E.005567.03.12 от 21.03.2012	2-(5-Хлор-2Н-бензотриазол-2-ил)-6-(1,1-диметилэтил)-4-метилфенол	3896-11-5/ 223-445-4	2-(3-трет-Бутил-2-гидрокси-5-метилфенил)-5-хлор-2Н-бензотриазол); Буметризол (Bumetrizole)	серия ВТ № 003656
38.	Tinuvin® 329	«BASF SE», D-67056 Ludwigshafen, Carl-Bosch Str., 38, Германия; производственные филиалы	ЗАО «БАСФ», 119017, г. Москва, Кадашевская наб., д. 14, к. 3 (Российская Федерация)	RU.77.99.34.008. E.005566.03.12 от 21.03.2012	2-(2Н-Бензотриазол-2-ил) -4-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенол	3147-75-9/ 221-573-5		серия ВТ № 003658
39.	Tinuvin® 571	«BASF SE», D-67056 Ludwigshafen, Carl-Bosch Str., 38, Германия; производственные филиалы	ЗАО «БАСФ», 119017, г. Москва, Кадашевская наб., д. 14, к. 3 (Российская Федерация)	RU.77.99.34.008. E.005565.03.12 от 21.03.2012	2-(2Н-Бензотриазол-2-ил)-6-додецил(линейный и разветвленный)-4-метилфенол	125304-04-3/ 401-680-5	2-(2Н-Бензотриазол-2-ил)-6-додецил-4-метилфенол линейный и разветвленный	серия ВТ № 003655
40.	SILANE CHM-DIMETHOXY	«Wacker Chemie AG», Hannz-Seidel-Plaz 4, 81737 Munich (Германия)	«Wacker Chemie AG», Hannz-Seidel-Plaz 4, 81737 Munich (Германия)	RU.77.99.88.008. E.006098.04.12 от 03.04.2012	Диметоксиметилциклогексилсилан	17865-32-6/ 402-140-1	Циклогексилдиметоксиметилсилан(	серия ВТ № 003363
41.	Datasoft NSF, Datasoft CSF	DATAKIM KIMYA SANAYI VE TICARET LTD.STI., Ikitelli organize sanayi bolgesi. Ataturk oto sanayi sitesi. 20.Sok. No:576 Ikitelli-K. Cekmece-ISTAMBUL/ TURKIYE (Турция)	ООО «Восток», 153032, г. Иваново, ул. Куликова, 8 (Российская Федерация)	RU.77.99.15.008. E.006090.04.12 от 03.04.2012	Жирные кислоты С12-20 эфиры с альфа-гидро-омега-гидроксиполи (окси-1,2-этиндиилом)	68908-68-9/	Оксиэтилированные жирные кислоты С12-20; полиоксиэтиленалканоат С12-20; этоксилированные жирные кислоты С12-20; жирные кислоты, С12-20 этоксилированные; деэмульгатор ОЖК; Олитекс МГ-Н, Олитекс МГ-К	серия ВТ № 001268
42.	Metoxypropylamine / Метоксипропиламин	«BASF SE», Carl-Bosch-Strasse 38, D-67056 Ludwigshafen, Germany (Германия)	ЗАО «БАСФ», 119017, г. Москва, Кадашевская наб., д. 14, к. 3 (Российская Федерация)	RU.77.99.34.008. E.006049.04.12 от 02.04.2012	3-Метоксипропиламин	5332-73-0/ 226-241-3	3-Метокси-1-пропиламин; 3-аминопропилметиловый эфир; гамма-метоксипропиламин; 1-амино-3-метоксипропан	серия ВТ № 003464
43.	UNIFOAM AZODICARBONAMIDE (вспенивающий агент)	«Hebron SA» Avenida Estacion, 61, 08120 La Liagosta, Barcelona-Spain (Испания)	ООО «Троцеллен РУС» 141650, Московская область, Клинский район, пгт. Высоковск, терр. а/д. «Лотошино-Суворово-Клин», 75+780м правая сторона, владение 1 (Российская Федерация)	RU.77.99.88.008. E.006000.03.12 от 30.03.2012	1,1'-Азобискарбоамид	123-77-3/ 204-650-8	Азобискарбонамид, азодикарбоамид, азобискарбоксамид, диазенедикарбоксоамид; азодикарбонамид (azodicarbonamide).	серия ВТ № 003084
44.	JH-174 (3-МЕТАКРИЛОКСИПРОПИЛТРИМЕТОКСИСИЛАН)	«Jingzhou Jianghan Fine Chemical CO., LTD» Luochang, Shashi, Jingzhou City, Hubei, 434005, China (Китайская Народная Республика)	ООО «Практик» 190020, Санкт-Петербург, ул. Лифляндская, д.6, кор. М, офис 216 (Российская Федерация)	RU.77.99.88.008. E.005999.03.12 от 30.03.2012	3-(Триметоксисилил) пропил-2-метил-проп-2-еноат	2530-85-0/ 219-785-8	(Триметоксисилил) пропилметакрилат, (гамма-(метакрилоилокси) пропил)триметоксисилан	серия ВТ № 003265
45.	МАРГАНЕЦ ЦИНК N-(2-(СУЛЬФО-КАРБОТИОИЛ-АМИНО) ЭТИЛ) ДИТИО-КАРБАМАТ/ MANGANOUS ZINC N-(2-(SULFIDO-CARBOTHIOYLANINO)ETHYL) DITHIOCARBAMATE	«Sharda Worldwide Exports Pvt. Ltd» Domnic Holm, 29-th road, Bandra(w), Mumbai - 400050, India (Индия)	ООО «ЭТР» 190020, г. Санкт-Петербург, ул. Лифляндская, д.6, корп. М, офис 3007 (Российская Федерация)	RU.77.99.88.008. E.005998.03.12 от 30.03.2012	N-(2-((Сульфанилиден (сульфид)метил) амино) этил) карбамодитиоат марганца (2+) цинка (2+)	172672-41-2/	(2-(Сульфидкарботиоиламино)этиламино) метан-дитиоат Mn (2+) Zn (2+)	серия ВТ № 003676
46.	Silan Si 69® (силан Si 69®)	301966, Evonik Degussa Antwerpen N.V., Inorganic Materials Tijsmanstunnel West B-2040 Antwerp, Бельгия; 297317, Evonik Degussa Corporation, Inorganic Materials 4201 Degussa Road Theodore, AL 36582 (США)	ООО «Эвоник Химия», 119330, г. Москва, ул. Мосфильмовская, дом 17Б (Российская Федерация)	RU.77.99.15.008. E.005975.03.12 от 30.03.2012	Бис[3-(триэтоксисилил)пропил]полисульфид	211519-85-6/	Бис(триэтоксисилилпропил)полисульфид	серия ВТ № 003315

№ п/п	Наименование продукта	Производитель	Получатель	Номер свидетельства о госрегистрации, дата регистрации	Наименование вещества по IUPAC	№ CAS/EC	Синонимы, торговые и фирменные названия	Номер РПО-ХБВ
47.	N-(2-((2,6-Dicyano-4-nitrophenyl)azo)-5-(diethylamino) phenyl)acetamide	Rokem Hongkong Limited, Unit 602, 6/F, Causeway Bay Commercial Building, 1 Sugar street, Causeway Bay, Hong Kong, Китайская Народная Республика(-ПРИЛОЖЕНИЕ)	ОАО «Пигмент», 392681, г. Тамбов, ул. Монтажников, д. 1 (Российская Федерация)	RU.77.99.15.008.E.005937.03.12 от 29.03.2012	N-[2-[(2,6-Дициан-4-нитрофенил) азо]-5-(диэтиламино) фенил]ацетамид	41642-51-7/ 255-473-8	5-(Диэтиламино)-2-(2,6-дициан-4-нитрофенилазо)ацетанилид	серия ВТ № 003666
48.	1-AMINO-4-GIDROXY-2-PHENOXY-ANTRACENE-9,10-DION	Rokem Hongkong Limited, Unit 602, 6/F, Causeway Bay Commercial Building, 1 Sugar street, Causeway Bay, Hong Kong, Китайская Народная Республика(-ПРИЛОЖЕНИЕ)	ОАО «Пигмент», 392681, г. Тамбов, ул. Монтажников, д. 1 (Российская Федерация)	RU.77.99.15.008.E.005936.03.12 от 29.03.2012	1-Амино-4-гидрокси-2-феноксиантрацен-9,10-дион	17418-58-5/ 241-442-6	1-Амино-4-гидрокси-2-феноксиантрахинон	серия ВТ № 000020
49.	5[(2-NITRO-4-CHLOROPHENIL) AZO]-3- CYANE-4-METHYL-6-HYDROXY-1-ETHYL-PYRIDONE-2 / 5-[(2-Нитро-4-хлорофенил) азо]-3- циан-4- метил-6- гидрокси-1-этилпиридон-2	Rokem Hongkong Limited, Unit 602, 6/F, Causeway Bay Commercial Building, 1 Sugar street, Causeway Bay, Hong Kong, Китайская Народная Республика (ПРИЛОЖЕНИЕ)	ОАО «Пигмент», 392681, г. Тамбов, ул. Монтажников, д. 1 (Российская Федерация)	RU.77.99.15.008.E.005935.03.12 от 29.03.2012	5-[(4-Хлор-2-нитрофенил)азо]-1-этил-1,2-дигидро-6-гидрокси-4-метил-2-оксо-3-пиридинкарбонитрил	86836-02-4/ 274-660-5	5-[(2-Нитро-4-хлорфенил)азо]-6-гидрокси-1,2-дигидро-4-метил-3 -циан-1-этилпиридин-2-он; 5 - [(4-хлор-2-нитрофенил)азо] -1-этил-1,2-дигидро-6-гидрокси-4-метил-2-оксоникотиннитрил	серия ВТ № 002005
50.	2[[-[(2-CYANETHEL)-ETHYLAMINO] PHENYL]AZO]-5-NITROBENZONITRILE	Rokem Hongkong Limited, Unit 602, 6/F, Causeway Bay Commercial Building, 1 Sugar street, Causeway Bay, Hong Kong, Китайская Народная Республика(-ПРИЛОЖЕНИЕ)	ОАО «Пигмент», 392681, г. Тамбов, ул. Монтажников, д. 1 (Российская Федерация)	RU.77.99.15.008.E.005934.03.12 от 29.03.2012	2-[[4-[[2-цианэтил)этиламино]фенил]-5-нитробензонитрил	12270-46-1/ 240-923-8	4-Нитро-2-циан-4,N'-этил-N,-бета-цианэтиламиноазобензол	серия ВТ № 000098
51.	2-[N-(2-Cyanoethyl)-4-[(2,6-dichloro-4-nitrophenyl) azo]anilino] ethyl acetate / 2-[N-(2-Цианоэтил)-4-[(2,6-дихлор-4-нитрофенил)азо] анилино]этил ацетат	Rokem Hongkong Limited, Unit 602, 6/F, Causeway Bay Commercial Building, 1 Sugar street, Causeway Bay, Hong Kong, Китайская Народная Республика (ПРИЛОЖЕНИЕ)	ОАО «Пигмент», 392681, г. Тамбов, ул. Монтажников, д. 1 (Российская Федерация)	RU.77.99.15.008.E.005933.03.12 от 29.03.2012	3-[[2-Ацетилокси)этил] [4-[(2,6-дихлор-4-нитрофенил)азо]фенил] амино]-пропаннитрил	5261-31-4/ 226-070-4	2,6-Дихлор-4-нитро-4'N-ацетоксиэтил-N, бета-цианэтиламинобензол; 2-[N-(2-цианэтил)-4-[(2,6-дихлор-4-нитрофенил)азо] анилин]-этилацетат	серия ВТ № 000051
52.	Триметилсилан	«DOW CORNING CORPORATION MIDLAND PLANT», 3901 S. SAGINAW RD, MIDLAND MI 48640, United States (США)	ООО «Эр Ликид», 109147, г. Москва, ул. Воронцовская, 17 (Российская Федерация)	RU.77.99.32.008.E.005928.03.12 от 28.03.2012	Триметилсилан	993-07-7/ 213-603-0	Триметилсилан; 3МС (3MS), ТМС (TMS)	серия ВТ № 003673
53.	Моноэтаноламин (MONOETHANOLAMINE, 100% GT GRADE)	The DOW Chemical Company, 2030 Willard H. Dow Center 48674 Midland, MI, USA (США)	Общество с ограниченной ответственностью «Резол» (ООО «Резол»), 197342, г. Санкт-Петербург, ул. Белоостровская, д.20, лит. Б, пом. 31-Н (Российская Федерация)	RU.77.99.32.008.E.005927.03.12 от 28.03.2012	2-Аминоэтанол	141-43-5/ 205-483-3	Аминоэтиловый спирт, 2-гидроксиэтиламин, бета-гидроксиэтиламин	серия ВТ № 000011
54.	Лауриновая кислота т.м. PALMERA A9912	«KLK EMMERICH GmbH» Steintor 9, 46446 Emmerich am Rhein, Germany (Германия)	ООО «Волга-химпромсервис» 603000, Нижний Новгород, ул. Звездинка, д.20 Б, помещение 6 (Российская Федерация)	RU.77.99.88.008.E.005859.03.12 от 28.03.2012	Додекановая кислота.	143-07-7/ 205-582-1	н-Додекановая кислота, 1-ундекарбоновая кислота; Лауриновая кислота	серия ВТ № 001784

№ п/п	Наименование продукта	Производитель	Получатель	Номер свидетельства о госрегистрации, дата регистрации	Наименование вещества по IUPAC	№ CAS/ ЕС	Синонимы, торговые и фирменные названия	Номер РПОХБВ
55.	Триэтиламин	«Henan Harvest International Co., Ltd» 24 Fl. No 1 Building, Fortune Plaza, No. 32 Jingsan Road, Zhengzhou, Henan, China, 450008 (Китайская Народная Республика)	«Henan Harvest International Co., Ltd» 24 Fl. No 1 Building, Fortune Plaza, No. 32 Jingsan Road, Zhengzhou, Henan, China, 450008 (Китайская Народная Республика)	RU.77.99.88.008.E.005857.03.12 от 28.03.2012	Триэтиламин	121-44-8/ 204-469-4	(Диэтиламин)этан; N,N-диэтилэтанамин; Triethylamine	серия ВТ № 000496
56.	Версатиковая кислота 10 / Versatic Acid 10	«Momentive Specialty Chemicals B.V.» Seattleweg 17 3195 ND Pernis - Rotterdam, The Netherlands (Нидерланды)	«Momentive Specialty Chemicals B.V.» Seattleweg 17 3195 ND Pernis - Rotterdam, The Netherlands (Нидерланды)	RU.77.99.88.008.E.005856.03.12 от 28.03.2012	2,5-Диметил-2-этилгексановая кислота	26896-20-8/ 248-093-9	Неодекановая кислота, 2,5,5-триметил-2-этилпентановая кислота	серия ВТ № 003664
57.	Альфа-Ацетилфенилацетонитрил(Alpha-Acetylphenylacetonitrile)	«TIANJIN WLSDM CHEMICALS CO. LTD». No.4 CuipingLu, Jingji Jishu Zone, Tianjin, China (Китайская Народная Республика)	«TIANJIN WLSDM CHEMICALS CO. LTD». No.4 CuipingLu, Jingji Jishu Zone, Tianjin, China (Китайская Народная Республика)	RU.77.99.88.008.E.005855.03.12 от 28.03.2012	альфа-Ацетилбензолацетонитрил	4468-48-8/ 224-737-4	2-Фенилацетоацетонитрил; 2-ацетил-2-фенилацетонитрил	серия ВТ № 001976
58.	Краситель - Солвент коричневый 41 70% / Solvent brown 41 70%	«ECORD» Leiebos 21 bus 84 2170 Merksem/ Antwerpen-Belgie; Dijkweg 159 2675 AD Honselersdijk (Нидерланды)	ОАО «Пигмент», 392681, Тамбов, ул. Монтажников, 1 (Российская Федерация)	RU.77.99.88.008.E.006572.04.12 от 12.04.2012	4,4`-[1,3-Фениленбис(азо)] бис-1,3-бензолдиамин	1052-38-6/ 213-888-1	4,4`-(1,3-Фениленбис(азо)бис-1,3-бензолдиамин	серия ВТ № 002865
59.	Краситель - Солвент коричневый 41 70% / Solvent brown 41 70%	«ECORD» Leiebos 21 bus 84 2170 Merksem/ Antwerpen-Belgie; Dijkweg 159 2675 AD Honselersdijk (Нидерланды)	ОАО «Пигмент», 392681, Тамбов, ул. Монтажников, 1 (Российская Федерация)	RU.77.99.15.008.E.006572.04.12 от 12.04.2012	4,4`-[1,3-Фениленбис(азо)] бис-1,3-бензолдиамин	1052-38-6/ 213-888-1	4,4`-(1,3-Фениленбис(азо)бис-1,3-бензолдиамин	серия ВТ № 002865
60.	2-[(2-Cyanoethyl) {4-[(E)-(4-nitrophenil) diazenil]phenil} amino]ethyl acetate	«Rokem Hongkong Limited» - Unit 602, 6/F, Causeway Bay Commercial Building, 1 Sugar street, Causeway Bay, Hong Kong; (ПРИЛОЖЕНИЕ)	ОАО «Пигмент», 392681, Тамбов, ул. Монтажников, 1 (Российская Федерация)	RU.77.99.88.008.E.006569.04.12 от 12.04.2012	3-[[2-(Ацетилокси)этил][4-[(4-нитрофенил)азо] фенил]амино] пропионитрил	61968-38-5/	2-[[4-(4-Нитрофенил)азофенил] (2-цианоэтил) амино]этилацетат; 3-((2-(ацетилокси) этил)(4-нитрофенил) азо)фенил)аминопропионитрил	серия ВТ № 003668

НОВЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТОКСИКОЛОГИИ И СМЕЖНЫМ ДИСЦИПЛИНАМ

- *Белобров Е.П.*.
Морская фумигация: Словарь-справочник по обеззараживанию грузов на судах и в портах
Издательство: Черномор`я, 2012, 334 с.
- **Большой энциклопедический справочник. Современные лекарственные препараты. 5000**
Издательство: - КСД , 2013, 544 с.
- *Будников Г.К., Гармонов С.Ю.*.
Фармацевтический анализ. Том 16
Издательство: АРГАМАК-МЕДИА , 2013, 778 с.
- *Жуков В.И.*
Защита и безопасность в чрезвычайных ситуациях
Издательство: НИЦ ИНФРА-М , 2013, 392 с.
- *Комаровский Е.О.*
Лекарственные средства в педиатрии
Издательство: ООО «Издательство Эксмо», 2013, 480 с.
- *Косолапова Н. В.* **Безопасность жизнедеятельности**
Издательство: КноРус , 2014, 192 с.
- *Михайлов Л.А.*
Методика обучения безопасности жизнедеятельности
Издательство: ОИЦ «Академия», 2013, 288 с.
- *В. В. Тетельмин, В. А. Язев.*
Основы экологического мониторинга
Издательство: Интеллект, 2013, 256 с.
- *Христофорова Н.К.* **Основы экологии**
Издательство: Магистр, 2013, 640 с.