

# ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ ВЕСТНИК

*Toxicological Review*

Научно-практический журнал

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



Российский регистр потенциально опасных  
химических и биологических веществ

№ 5 (128), 2014

СОДЕРЖАНИЕ

CONTENTS

Р.Д. Сюбаев, И.Н. Немкова, Г.Н. Енгальчева, Т.А. Гуськова, А.Н. Васильев. ДОКЛИНИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА БЕЗОПАСНОСТИ ПРЕПАРАТОВ, СОДЕРЖАЩИХ КОМБИНАЦИИ ИЗВЕСТНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ.....	2
Л.И. Привалова, Б.А. Кациельсон, Н.В. Логинова, В.Б. Гурвич, В.Я. Шур, Я.Б. Бейкин, М.П. Сутункова, И.А. Минигалиева, Е.В. Шишкина, С.В. Пичугова, Л.Г. Тулакина, С.В. Беляева, В.О. Рузанов. ЦИТОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ЖИДКОСТИ, ПОЛУЧАЕМОЙ ПРИ БРОНХО- АЛЬВЕОЛЯРНОМ ЛАВАЖЕ У КРЫС ПОСЛЕ ИНТРАТРАХЕАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ НАНОРАЗМЕРНЫХ МЕДНОКСИДНЫХ ЧАСТИЦ.....	8
А.В. Бабкин, И.С. Бердинских, Н.С. Осечкина, Г.В. Назаров, М.А. Юдин, В.Н. Быков, А.М. Сарана АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНА ВСНС С АКТИВНОСТЬЮ БУТИРИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ КРЫС ПОСЛЕ ОТРАВЛЕНИЯ МАЛАТИОНОМ.....	16
Н.А. Мартынова, Л.Г. Горохова ОЦЕНКА ТОКСИЧНОСТИ 3-БРОМАМИНОБЕНЗОЛА СУЛЬФАТА КАК ОСНОВА ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО РИСКА ЗДОРОВЬЮ.....	21
М.А. Пинигин, О.В. Бударина, Л.А. Федотова, А.А. Сафулин, А.В. Цуканов МЕТИЛМЕРКАПТАН.....	26
А.В. Карамышева, Г.В. Сон, Н.М. Перова, М.В. Мнихович, С.А. Успенский, П.Л. Иванов, В.Н. Хабаров, М.А. Селянин ТОКСИКОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА БИОАКТИВНЫХ КОМПОЗИЦИЙ НА ОСНОВЕ МОДИФИЦИРОВАННОЙ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ, ВИТАМИНАМИ И АМИНОКИСЛОТАМИ.....	29
<input type="checkbox"/> Экологическая токсикология	
А.С. Федотов ОЦЕНКА ТОКСИЧНОСТИ ПРЕПАРАТА MAX PLEX ДЛЯ ГИДРОБИОНТОВ.....	34
Г.А. Даллакян, С.И. Погосян, В.И. Ипатова, И.В. Агеева ИНАКТИВАЦИЯ ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ БИХРОМАТА КАЛИЯ ШУНГИТОМ НА РАЗВИТИЕ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ.....	39
<input type="checkbox"/> Съезды, конференции, совещания.....	45
<input type="checkbox"/> Юбилейные даты Е.А. Лужников.....	47
<b>БЮЛЛЕТЕНЬ РОССИЙСКОГО РЕГИСТРА ПОТЕНЦИАЛЬНО ОПАСНЫХ ХИМИЧЕСКИХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ</b>	
<input type="checkbox"/> Новые публикации по токсикологии и смежным дисциплинам.....	48

R.D. Syubaev, I.N. Nemkova, G.N. Engalycheva, T.A. Guskova, A.N. Vasiliev. PRE-CLINICAL SAFETY EVALUATION OF PREPARATIONS CONTAINING A COMBINATION OF KNOWN DRUGS.....	2
L.I. Privalova, B.A. Katsnelson, N.V. Logina, V.B. Gurvich, V. Ya. Shur, Ya.B. Belkin, M. P. Sutunkova, I.A. Minigaljeva, E.V. Shishkina, S. V. Pichugova, L. G. Tulakina, S.V. Beljajeva, V. O. Rusakov. CYTOLOGICAL AND BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF BRONCHOALVEOLAR LAVAGE FLUID IN RATS AFTER INTRATRACHEAL INSTILLATION OF COPPER OXIDE NANO-SCALE PARTICLES.....	8
A.V. Babkin, I.S. Berdinskih, N.S. Osechkina, G.V. Nazarov, M.A. Judin, V.N. Bykov, A.M. Sarana ASSOCIATION OF BCHE GENE POLYMORPHIC VARIANTS WITH BUTYRYLCHOLINESTERASE ACTIVITY IN RATS POISONED WITH MALATHION.....	16
N.A. Martynova, L.G. Gorokhova EVALUATION OF TOXICITY OF 3-BROMO AMINOBENZENE SULFATE AS A BASIS FOR PREDICTION OF OCCUPATIONAL RISK TO HEALTH.....	21
M.A. PiniGIN, O.V. Bударina, L.A. Fedotova, A.A. Safulin, A.V. Tsukanov METHYL MERCAPTAN.....	26
A.V. Karamysheva, G.V. Son, N.M. Perova, M.V. Mnikhovich, S.A. Uspenskiy, P.L. Ivanov, V.N. Khabarov, M.A. Selyanin TOXICOLOGICAL EVALUATION OF BIOACTIVE COMPOSITIONS BASED ON HYALURONIC ACID MODIFIED WITH VITAMINS AND AMINO ACIDS.....	29
<input type="checkbox"/> Ecotoxicology	
A.S. Fedotov ASSESSMENT OF THE TOXICITY OF SUBSTANCE MAX PLEX TO HYDROBIONTS.....	34
G.A. Dallakyan, S.I. Pogosyan, V.I. Ipatova, I.V. Ageeva INACTIVATION OF TOXIC ACTION OF POTASSIUM DICHROMATE ON GROWTH OF MICROALGAE USING SHUNGITE.....	39
<input type="checkbox"/> Congresses, conferences, meetings.....	45
<input type="checkbox"/> Anniversaries E.A. Luginov.....	47
<b>BULLETIN OF THE RUSSIAN REGISTER OF POTENTIALLY HAZARDOUS CHEMICAL AND BIOLOGICAL SUBSTANCES</b>	
<input type="checkbox"/> New publications on toxicology and related disciplines.....	48

# ДОКЛИНИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА БЕЗОПАСНОСТИ ПРЕПАРАТОВ, СОДЕРЖАЩИХ КОМБИНАЦИИ ИЗВЕСТНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Р.Д. Сюбаев<sup>1</sup>, И.Н. Немкова<sup>1</sup>,  
Г.Н. Енгальчева<sup>1</sup>, Т.А. Гуськова<sup>2</sup>,  
А.Н. Васильев<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» (ФГБУ «НЦЭСМП») Минздрава России, 127051,

г. Москва, Российская Федерация

<sup>2</sup>Некоммерческое партнерство содействия здравоохранению «Научный центр контроля качества» (НП СЗ НЦКК), 109074,

г. Москва, Российская Федерация

Программа экспериментальных исследований новых комбинированных препаратов, содержащих известные лекарственные средства, включает изучение общетоксического действия комбинации, но, как правило, не предусматривает исследований токсичности ее активных компонентов. Факт медицинского применения этих лекарственных средств предполагает наличие достаточных доклинических и клинических данных, подтверждающих их эффективность и безопасность. Однако фрагментарность или противоречивость доступных для разработчика сведений о токсических свойствах лекарственных средств существенно ограничивают возможность использования литературных данных для характеристики ожидаемого профиля токсичности комбинации, прогнозирования и выявления эффектов взаимодействия. На примере фиксированной комбинации метамизола натрия и ибупрофена проведены прогнозистическая и экспериментальная доклиническая оценки безопасности токсикологического взаимодействия активных компонентов. Используются аналитические приемы оценки адекватности программы экспериментальных исследований и интерпретации результатов токсикологического изучения комбинированного препарата.

**Ключевые слова:** комбинированные лекарственные препараты, доклиническая оценка безопасности, экспериментальные исследования, прогнозирование, токсикологическое взаимодействие.

**Введение.** Уникальность комбинированных лекарственных препаратов обусловлена возможным изменением свойств лекарственных средств при совместном применении вследствие воздействия активных компонентов на общие мишени фармакологического действия, токсичности и биотрансформации [1, 2, 3]. В связи с этим принципиально важной характеристикой безопасности комбинированных препаратов, наряду с определением суммарного спектра токсических свойств комбинации, является оценка потенциальных взаимодействий

ее компонентов. Ожидаемые токсические свойства комбинированных препаратов, содержащих известные лекарственные средства, могут быть охарактеризованы *a priori* по сумме токсических свойств его компонентов только в том случае, если такая информация доступна и достаточно подробно изложена. Отсутствие достаточных сведений о токсичности активных компонентов не позволяет провести анализ их потенциального токсикологического взаимодействия и может стать причиной неадекватной доклинической оценки безопасности

**Сюбаев Рашид Даутович (Syubaev Rashid Dautovich)**, доктор медицинских наук, начальник управления экспертизы лекарственных средств №4 Центра экспертизы и контроля готовых лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 127051, г. Москва, Subaev@expmed.ru

**Немкова Ирина Николаевна (Nemkova Irina Nikolaevna)**, эксперт первой категории управления экспертизы лекарственных средств №1 Центра экспертизы и контроля готовых лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 127051, г. Москва, Nemkova@expmed.ru

**Енгальчева Галина Нинелевна (Engalycheva Galina Ninelevna)**, кандидат биологических наук, ведущий эксперт управления экспертизы лекарственных средств №3 Центра экспертизы и контроля готовых лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 127051, г. Москва, Engalycheva@expmed.ru

**Гуськова Татьяна Анатольевна (Guskova Tatyana Anatolievna)**, член-корреспондент РАМН, заслуженный деятель науки Российской Федерации, доктор медицинских наук, профессор, руководитель отдела оценки эффективности и безопасности лекарственных средств НП СЗ «Научный центр контроля качества», 109074, г. Москва, tagus@rambler.ru

**Васильев Андрей Никифорович (Vasiliev Andrey Nikiforovich)**, доктор биологических наук, директор Центра экспертизы и контроля готовых лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 127051, г. Москва, Vasiliev@expmed.ru

нового комбинированного препарата. Методические руководства по изучению комбинированных препаратов носят рекомендательный характер и не содержат жестких предписаний выполнять исследования по определенной программе или дизайну, вследствие чего характеристика безопасности таких препаратов нередко оказывается недостаточной.

**Материалы и методы исследования.** Проведена оценка безопасности гипотетической комбинации метамизола натрия и ибупрофена по литературным данным о токсических свойствах этих нестероидных противовоспалительных средств (НПВС). В качестве информационных источников использованы базы данных, содержащие сведения о токсичности и биотрансформации лекарственных средств, в интернет-ресурсах Toxnet [4] и DrugBank [5], также сведения о побочном действии и межлекарственных взаимодействиях из инструкций по медицинскому применению лекарственных препаратов [6] и стандартов лечения [7]. Для оценки безопасности комбинированных препаратов применен комплексный подход, включающий сочетание прогнозирования с анализом результатов экспериментальных исследований токсикологического взаимодействия [3, 8]. Риск потенциальных взаимодействий оценивали по наличию общих мишеней токсического действия компонентов комбинации с помощью аналитических таблиц. Ожидаемые гипотетические значения клинических и доклинических дозовых параметров безопасности комбинации (терапевтической дозы или  $LD_{50}$ ) рассчитывали по формуле аддитивного действия, исходя из терапевтических доз или  $LD_{50}$  компонентов и их дозировки (или соотношения) в данной комбинации:

*ожидаемая доза комбинации A+B* =  $d_A + d_B / (d_A / \text{факт. доза A} + d_B / \text{факт. доза B})$ ,

где *ожидаемая доза комбинации A+B* – гипотетическая терапевтическая доза или  $LD_{50}$  комбинации компонентов A и B;

$d_A$  и  $d_B$  – абсолютные дозировки или соотношения дозировок компонентов A и B в комбинации;

*факт. доза A* и *факт. доза B* – фактические значения терапевтических доз или  $LD_{50}$  компонента A и компонента B.

Эффекты токсикологического взаимодействия определяли сопоставлением ожидаемых и фактических характеристик токсичности комбинации. Характер возможного взаимодействия лекарственных средств по результатам изучения острой токсичности (на мышах при внутрижелудочном введении) оценивали путем сравнения фактического экспериментального значения  $LD_{50}$  комбинации с гипотетическими значениями  $LD_{50}$  комбинации, вычисленными исходя из экспериментальных значений  $LD_{50}$  ибупрофена и метамизола натрия, а также с использованием значений  $LD_{50}$  этих лекарственных средств по литературным данным.

## Результаты и обсуждение.

### 1. Анализ сведений о клинической безопасности компонентов комбинации

*Ожидаемый суммарный профиль безопасности комбинации* представляет собой совокупность мишеней фармакодинамического действия отдельных компонентов комбинации, которые определяются по клинической информации о побочном действии, противопоказаниях и взаимодействиях, содержащейся в инструкциях по применению (табл. 1). Анализ клинических данных, содержащихся в инструкции, показывает, что рассматриваемая комбинация метамизол натрия + ибупрофен (1:1) характеризуется установленным клиническим взаимодействием ее компонентов, который может проявиться взаимным усилением их токсичности. Ожидаемый суммарный профиль безопасности этой комбинации складывается из нежелательных реакций со стороны нервной, сердечно-сосудистой, дыхательной, пищеварительной, мочевыделительной, иммунной, кроветворения и свертывающей системы крови.

*Потенциальные фармакодинамические взаимодействия компонентов комбинации*, определяемые по наличию общих мишеней, могут проявляться количественным или качественным изменением ожидаемых побочных реакций. Как видно из данных, представленных в таблице 1, такими мишенями потенциальных взаимодействий в первую очередь являются: печень, почки, иммунная система, кроветворение. Во-вторую очередь следует отнести сердечно-сосудистую, нервную, дыхательную системы, гемостаз.

*Оценка потенциальных взаимодействий компонентов комбинации на уровне биотрансформации* имеет важное значение для прогноза безопасности клинических исследований и определения критических мишеней для токсикологических исследований. Анализ влияния компонентов комбинации на систему цитохрома P450 показывает, что для комбинации метамизол натрия + ибупрофен фармакокинетическое взаимодействие типа «ингибитор-субстрат» или «индуктор-субстрат», по-видимому, не имеет существенного значения, поскольку у них нет общих мишеней биотрансформации (табл. 2). Вместе с тем комбинированный препарат может взаимодействовать на уровне биотрансформации с другими лекарственными средствами, являющимися субстратами CYP 3A4, 2B6, 2C9.

*Прогноз безопасной терапевтической дозы и клинической доминанты комбинации*

Ожидаемая безопасная суточная доза, вычисленная по формуле аддитивности, для комбинации метамизол натрия + ибупрофен (1:1) составляет 1714 мг [ $2 / (1/3000 + 1/1200) = 1714$ ] исходя из максимальных суточных терапевтических доз этих препаратов и их количественного соотношения в комбинации.

Анализ клинических данных о свойствах активных компонентов с учетом эквивалентности их количественного соотношения в комбинации позволяет определить относительную клиническую доминанту безопасности комбинированного препарата, т.е. компонент или компоненты, которые могут внести преимущественный вклад в характеристику свойств комбинации. В комбинации метамизол натрия + ибупрофен для избранного состава (1:1) доминантой профиля безопасности и эффективности является ибупрофен, поскольку при равном количественном соотношении компонентов в комбинации его максимальная суточная доза (1200 мг) в 2,5 раза меньше максимальной суточной дозы метамизола натрия (3000 мг), т.е. возможное относительное доминирование ибупрофена над метамизолом натрия выражается отношением 2,5:1. Для прогноза это означает, что нежелательные свойства ибупрофена могут превалировать над свойствами метами-

зола натрия и могут определять базовый профиль безопасности комбинации в целом. В связи с этим при прочих равных условиях определение доминанты комбинации является основанием для корректировки конечных точек и порядка мониторинга органов-мишеней.

Определение очередности (порядка) мониторинга мишеней потенциального взаимодействия по результатам анализа клинических свойств известных компонентов новых комбинированных препаратов может оказаться полезным для интерпретации результатов токсикологических исследований, а также для обоснования необходимости дополнительных доклинических исследований и последующего клинического и пострегистрационного мониторинга их безопасности.

**2. Анализ сведений о токсичности активных компонентов комбинации**

На основании литературных сведений о токси-

Таблица 1

**Ожидаемый профиль безопасности и взаимодействия комбинации лекарственных средств**

Компоненты комбинации/ Комбинация	ЦНС	Серд.-сосуд.- система	Дыхательная система	Пищев. система	Мочевыделительная система	Иммунная система	Кровотворение	Гемостаз	Макс. суточная доза, мг
Метамизол натрия	(0)	(±)	(0)	(+)	(+)	(+)	(+)	(0)	3000
Ибупрофен	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	1200
Комбинация метамизол натрия + ибупрофен (1:1)	(0 +)	(± +)	(0 +)	(+ +)	(+ +)	(+ +)	(+ +)	(0 +)	1714(*)

Примечание: (+) – наличие эффекта, (±) – разноречивые данные, (0) – отсутствие данных, комбинация имеет двойные обозначения по сумме компонентов.  
(\*) – ожидаемая максимальная суточная доза комбинации, вычисленная по формуле аддитивности.

Таблица 2

**Потенциальные фармакокинетические взаимодействия компонентов  
(из базы данных DrugBank [5])**

Компоненты комбинации	Изоферменты цитохрома P450				
	3A4	2B6	2C8	2C9	2C19
Метамизол натрия	Инд	Инд			
Ибупрофен			C	C Инг	C

Примечание: Инг – ингибитор, Инд – индуктор, C – субстрат.

ческих свойствах компонентов комбинации из базы данных Toxnet составлен прогноз токсикологического профиля комбинации метамизол натрия + ибупрофен (табл. 3).

*Оценка характера и дефицита имеющихся токсикологических данных.* В указанных источниках имеется информация о мишенях общетоксического действия и отдельных токсических эффектах метамизола натрия и ибупрофена, их ЛД<sub>50</sub> для мышей и крыс. Сведения о специфических видах токсичности включают данные о репротоксических, генотоксических и канцерогенных свойствах. При этом отмечен абсолютный дефицит токсикологических данных, характеризующих влияние компонентов на фертильность и постнатальное развитие, практически неопределенны ожидаемые канцерогенные свойства комбинации. Менее определены генотоксические свойства комбинации *in vivo*.

*Ожидаемый суммарный профиль токсичности комбинации (общетоксическое действие и специфическая токсичность).* Ожидаемыми мишенями общетоксического действия комбинации являются печень, почки, кроветворение, ЖКТ, гемостаз. Комбинация обладает потенциальными репротоксическими свойствами (влияние на эмбриофетальное развитие), генотоксическими свойствами *in vitro*. Не исключены канцерогенные и мутагенные (*in vivo*) свойства комбинации, а также ее возможное влия-

ние на фертильность и постнатальное развитие.

*Потенциальные токсикологические взаимодействия.* Общие мишени токсического действия, а также отсутствие определенных сведений о токсических свойствах метамизола натрия и ибупрофена определяют следующие потенциальные их взаимодействия при комбинированном применении: печень, почки, кроветворение.

*Прогноз токсикометрических параметров комбинации.* Ожидаемые значения ЛД<sub>50</sub> комбинации (1:1), вычисленные по формуле аддитивности на основании литературных сведений о ЛД<sub>50</sub> ибупрофена и метамизола натрия, для мышей составляет 1178 мг/кг, для крыс – 1049 мг/кг. Токсикометрических параметров по результатам исследования субхронической и хронической токсичности компонентов комбинации литературные сведения не содержат, что в значительной степени ограничивает возможности прогнозирования токсикологического профиля комбинированного препарата.

**3. Анализ результатов экспериментальных исследований**

Сравнительный дизайн экспериментального изучения острой токсичности метамизола натрия и ибупрофена и их комбинации (1:1) позволяет оценить характер возможного токсикологического взаимодействия этих лекарственных средств (табл. 4). Полученные результаты свидетельствуют о тен-

Таблица 3

**Прогноз токсикологического профиля комбинации Ибупрофен + Метамизол натрия (1:1) по данным литературы о токсичности активных компонентов в эксперименте (из базы данных Toxnet [4])**

Компонент	Общетоксическое действие		Репродуктивная токсичность			Генотоксичность		Канцерогенность
	мишени	ЛД <sub>50</sub> мг/кг, внутрь, мыши/крысы	фертильность	эмбрио-фетальное развитие	постнатальное развитие	<i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>	
Ибупрофен	ЖКТ, печень, почки, кроветворение, гемостаз	740/636	0	+	0	-	+	0
Метамизол натрия	Кроветворение, печень, почки	2891/ 3000	0	+	0	±	-	±
Комбинация Ибупрофен + Метамизол натрия (1:1)	Печень, почки, кроветворение ЖКТ, гемостаз	1178/ 1049	(0 0)	(+ +)	(0 0)	(± -)	(+ -)	(0 ±)

Примечание: (+) – наличие эффекта, (-) – отсутствие эффекта, (±) – разноречивые данные, (0) – отсутствие данных.

денции к синергизму токсического действия метамизола натрия и ибупрофена, т.к. ожидаемое значение  $LD_{50}$  комбинации (2749 мг/кг), вычисленное по формуле аддитивности, исходя из экспериментальных значений  $LD_{50}$  компонентов и их соотношения (1:1), на 25% больше его фактического значения (2193 мг/кг). Использование литературных сведений о  $LD_{50}$  метамизола натрия и ибупрофена для оценки эффектов взаимодействия вместо значений их  $LD_{50}$ , полученных при экспериментальном изучении острой токсичности комбинированного препарата, в нашем примере могло привести к противоположному выводу. Так, ожидаемое значение  $LD_{50}$  комбинации метамизол натрия + ибупрофен (1:1), вычисленное по литературным данным, составляет 1178 мг/кг и почти в 2 раза меньше (54%) фактического экспериментального значения  $LD_{50}$  комбинации (2193 мг/кг), что соответствует выводу об отчетливом токсикологическом антагонизме активных компонентов.

Этот факт свидетельствует о возможной ошибке при интерпретации результатов экспериментальных исследований с помощью литературных данных о токсичности активных компонентов и подтверждает необходимость сравнительного дизайна экспериментального изучения комбинированного препарата – «комбинация/отдельные компоненты».

Очевидным преимуществом доклинической оценки новых комбинированных препаратов, содержащих известные лекарственные средства, яв-

ляется возможность анализа имеющихся клинических данных и возможности прогнозирования безопасности взаимодействия активных компонентов, что в определенной степени может компенсировать дефицит токсикологических сведений и возможные ошибки экстраполяции экспериментальных данных на человека. Анализ свойств отдельных компонентов комбинации позволяет прогнозировать ожидаемый профиль токсичности комбинированного препарата, спланировать адекватную программу исследований и определить конечные точки экспериментального изучения комбинации, т.е. наиболее вероятные мишени потенциального взаимодействия. Данные литературы о токсичности компонентов комбинации помогают спланировать адекватную программу экспериментальных исследований комбинированного препарата с учетом отсутствия тех или иных данных, необходимых для полноценного прогноза безопасности. Вместе с тем эти сведения не всегда могут быть использованы непосредственно для прогнозирования и анализа результатов экспериментальных исследований вследствие их возможной противоречивости или фрагментарности. В связи с этим токсикологические исследования препаратов, содержащих новые комбинации известных лекарственных средств, необходимо проводить в сравнении с отдельными компонентами комбинации с целью выявления характера их возможного взаимодействия.

Таблица 4

**Интерпретация результатов изучения острой токсичности комбинации метамизола натрия и ибупрофена на мышах при внутрижелудочном введении**

Компоненты комбинации/ Комбинация	Экспериментальные данные		Данные литературы	
	$LD_{50}$ фактическая, мг/кг [д.и.] $p = 0,95$	$LD_{50}$ ожидаемая, мг/кг	$LD_{50}$ фактическая, мг/кг	$LD_{50}$ ожидаемая, мг/кг
Ибупрофен	2002 [1422-2582]	-	740(*)	-
Метамизол натрия	4383 [3967- 4799]	-	2891(*)	-
Комбинация Ибупрофен+Метамизол натрия (1:1)	2193 [1513-2873]	2749	-	1178
Соотношение фактической и ожидаемой $LD_{50}$ комбинации	1	1,25	-	0,54

Примечание: (\*) По базе данных Toxnet [4].

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гуськова Т.А., Субаев Р.Д. Влияние комбинаторного фактора на достоверность теоретического прогноза эффектов многокомпонентного токсикологического взаимодействия. Токсикологический вестник. 2003; 4: 2–11.
2. Гуськова Т.А., Субаев Р.Д. Токсикологические аспекты одновременного использования различных лекарственных средств. В кн.: Т.А. Гуськова. Токсикология лекарственных средств. М.: Издательский дом «Русский врач»; 2003. 116–140.
3. Субаев Р.Д., Енгальчева Г.Н. Доклиническая оценка безопасности лекарственного взаимодействия. Лекарственные средства. 2011; 3: 39–44.
4. База данных Toxnet. Available at: <http://toxnet.nlm.nih.gov>
5. База данных DrugBank. Available at: <http://www.drugbank.ca>
6. Государственный реестр лекарственных средств. Available at: <http://grls.rosminzdrav.ru>
7. Чучалин А.Г., Яценев В.В., ред. Федеральное руководство по использованию лекарственных средств (формулярная система). Выпуск XV. М.: Эхо, 2014.
8. Миронов А.Н., ред. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: Гриф и К, 2012.

## REFERENCES:

1. Guskova T.A., Syubaev R.D. Combinatorial factors influence the reliability of the theoretical prediction of toxicological effects of multi-component interaction. Toksikologicheskij vestnik. 2003, 4: 2–11 (in Russian).
2. Guskova T.A., Syubaev R.D. Toxicological aspects of the simultaneous use of different drugs. In: Guskova T.A. Toxicology of drugs. Moscow: Russkij vrach Publ.; 2003:116–40 (in Russian).
3. Syubaev R.D., Engalycheva G.N. Preclinical safety assessment of drug interactions. Lekarstvennye sredstva. 2011, 3: 39–44 (in Russian).
4. Toxnet (data base). Available at: <http://toxnet.nlm.nih.gov>. (accessed 17 April 2014).
5. DrugBank (data base). Available at: <http://www.drugbank.ca> (accessed 11 February 2014).
6. State register of medicines. Available at: <http://grls.rosminzdrav.ru>. (accessed 26 March 2014).
7. Chuchalin A.G., Jasnecov V.V., eds. Federal guidelines on the use of drugs (formulary system). 15<sup>th</sup> ed. Moscow: Jeho, 2014 (in Russian).
8. Mironov A.N., ed. in ch. Guidelines for pre-clinical trials of drugs. part 1. Moscow: Grif i K, 2012 (in Russian).

R.D. Syubaev<sup>1</sup>, I.N. Nemkova<sup>1</sup>, G.N. Engalycheva<sup>1</sup>, T.A. Guskova<sup>2</sup>, A.N. Vasiliev<sup>1</sup>

### PRE-CLINICAL SAFETY EVALUATION OF PREPARATIONS CONTAINING A COMBINATION OF KNOWN DRUGS

<sup>1</sup> Federal State Budgetary Institution «Scientific Center of Medical Application Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 127051, Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup> Non-commercial partnership of healthcare assistance «Scientific centre of quality control», Moscow, Russian Federation

A program of investigational studies of new combined preparations containing known medications includes investigation into general toxic effect of a combination but does not plan investigations into toxicity of its active components. The medical application of these medications assumes that pre-clinical and clinical data proving their effectiveness and safety are sufficient. But a fragmentary and controversial nature of data about toxicity of drugs available to those involved in new drug development significantly restricts the use of literature data in characterizing a combination toxicity expected profile, predicting and identifying the interaction effects. A prognostic and experimental evaluation of active components toxicological interaction was performed using the example of the metamizole sodium and ibuprofen fixed combination. The adequacy evaluation of the program of investigational studies and interpretation results of the combined preparation toxicological assessment was carried out using a common analytical practice.

**Key words:** combined medications, pre-clinical safety evaluation, investigational studies, prediction, toxicological interaction.

# ЦИТОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ЖИДКОСТИ, ПОЛУЧАЕМОЙ ПРИ БРОНХО-АЛЬВЕОЛЯРНОМ ЛАВАЖЕ У КРЫС ПОСЛЕ ИНТРАТРАХЕАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ НАНОРАЗМЕРНЫХ МЕДНОКСИДНЫХ ЧАСТИЦ

Л.И. Привалова<sup>1</sup>, Б.А. Кацнельсон<sup>1</sup>,  
Н.В. Логинова<sup>1</sup>, В.Б. Гурвич<sup>1</sup>, В.Я. Шур<sup>2</sup>,  
Я.Б. Бейкин<sup>3</sup>, М.П. Сутункова<sup>1</sup>,  
И.А. Минигалиева<sup>1</sup>, Е.В. Шишкина<sup>2</sup>,  
С.В. Пичугова<sup>3</sup>, Л.Г. Тулакина<sup>3</sup>,  
С.В. Беляева<sup>3</sup>, В.О. Рузаков<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФБУН «Екатеринбургский медицинский научный центр профилактики и охраны здоровья рабочих промпредприятий» Роспотребнадзора, 620014, г. Екатеринбург, Российская Федерация

<sup>2</sup>Центр коллективного пользования «Современные нанотехнологии» Уральского федерального университета, 620000, г. Екатеринбург, Российская Федерация

<sup>3</sup>МУ «Клинико-диагностический центр», 620142, г. Екатеринбург, Российская Федерация

**С**табильные водные суспензии частиц оксида меди диаметром 20 нм и меднооксидных-медных частиц диаметром 340 нм были введены крысам интратрахеально в дозе 0,5 мг (1 мл), и через 24 часа был проведен бронхо-альвеолярный лаваж, охарактеризованный с помощью оптической, просвечивающей электронной и полуконтактной атомно-силовой микроскопии и ряда биохимических показателей. Найдено, что обе фракции оказывают выраженное токсическое действие на лёгкие, однако наночастицы существенно токсичнее, чем субмикронные частицы крупнее 100 нм, но в то же время их отложение вызывает более выраженную защитную реакцию мобилизации альвеолярных макрофагов и особенно нейтрофильных лейкоцитов при более высокой фагоцитарной активности этих клеток. Полученные результаты в сопоставлении с литературными данными свидетельствуют о том, что причинами высокой цитотоксичности действия меднооксидных частиц нанометровой размерности является как внутриклеточный релиз ионов меди при их растворении, так и прямой контакт персистирующих частиц с клеточными органеллами (в первую очередь митохондриями) и их повреждение.

**Ключевые слова:** ультратонкие медьсодержащие частицы, бронхоальвеолярный лаваж, цитотоксичность.

**Привалова Лариса Ивановна (Privatova Larisa Ivanovna)**, доктор медицинских наук, профессор, заведующая лабораторией научных основ биопрофилактики ФБУН ЕМНЦПОЗРПП, 620014, г. Екатеринбург, privalovali@yahoo.com

**Кацнельсон Борис Александрович (Katsnelson Boris Aleksandrovich)**, доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделом токсикологии и биопрофилактики ФБУН ЕМНЦПОЗРПП, 620014, г. Екатеринбург, bkaznelson@etel.ru

**Логинова Надежда Владимировна (Loginova Nadezhda Vladimirovna)**, научный сотрудник лаборатории научных основ биопрофилактики ФБУН ЕМНЦПОЗРПП, 620142, г. Екатеринбург, loginovan@ymtc.ru

**Гурвич Владимир Борисович (Gurvich Vladimir Borisovich)**, доктор медицинских наук, директор ФБУН ЕМНЦПОЗРПП, 620014, г. Екатеринбург, gurvich@ymtc.ru

**Шур Владимир Яковлевич (Shur Vladimir Yakovlevich)**, доктор физико-математических наук, профессор, директор Центра коллективного пользования «Современные нанотехнологии», 620000, г. Екатеринбург, vladimir.shur@usu.ru

**Бейкин Яков Борисович (Beikin Yakov Borisovich)**, доктор медицинских наук, профессор, директор МУ «Клинико-диагностический центр», 620142, г. Екатеринбург, kdc\_boss@mail.ru

**Сутункова Марина Петровна (Sutunkova Marina Petrovna)**, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отдела токсикологии и биопрофилактики ФБУН ЕМНЦПОЗРПП, 620014, г. Екатеринбург, sutunkova@ymtc.ru

**Минигалиева Ильзира Амировна (Minigalleva Ilyzira Amirovna)**, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела токсикологии и биопрофилактики ФБУН ЕМНЦПОЗРПП, 620014, г. Екатеринбург, ilzira-minigalleva@yandex.ru

**Шишкина Екатерина Владимировна (Shishkina Ekaterina Vladimirovna)**, кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник Центра коллективного пользования «Современные нанотехнологии», 620000, г. Екатеринбург, ekaterina.shishkina@labfct.usu.ru

**Пичугова Светлана Владимировна (Pichugova Svetlana Vladimirovna)**, специалист лаборатории электронной микроскопии «Клинико-диагностический центр», 620142, г. Екатеринбург, ekb-lem@mail.ru

**Тулакина Людмила Геннадьевна (Tulakina Ludmila Gennadevna)**, кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией электронной микроскопии «Клинико-диагностический центр», 620142, г. Екатеринбург, tulakina@inbox.ru

**Беляева Светлана Валентиновна (Belyayeva Svetlana Valentinovna)**, кандидат биологических наук, заведующий биохимической лабораторией МУ «Клинико-диагностический центр», 620142, г. Екатеринбург, kdc\_boss@mail.ru

**Рузаков Вадим Олегович (Rusakov Vadim Olegovich)**, аспирант ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП, 620014, г. Екатеринбург, ruzakov\_vo@66.rospotrebнадzor.ru

**Введение.** Если еще 5 лет тому назад было вполне оправданным предостережение, что «общепринятая убежденность в особой токсичности наночастиц основана на ограниченном числе исследований» [1], то к настоящему времени экспериментальных подтверждений этой убежденности накоплено немало, хотя другая не менее распространенная идея, согласно которой наночастицы особо опасны еще и потому, что якобы не распознаются защитными физиологическими механизмами (в частности, легочными макрофагами [2]), скорее всего ошибочна. В частности, нашими исследованиями, проведенными с наночастицами (НЧ) оксида железа [3–5], золота и серебра [6], их высокая токсичность и вместе с тем особая активность защитной реакции фагоцитоза при их отложении в глубоких дыхательных путях были показаны при сравнении с действием соответствующих по химическому составу микрочастиц (МЧ) диаметром 1 мкм. В пределах условленного нанодиапазона (до 100 нм) эти особенности также тем менее выражены, чем больше размеры НЧ.

Вместе с тем, в известных нам экспериментальных исследованиях не оценивались с этих позиций различия между НЧ и частицами, имеющими размеры более 100 нм, но менее 1 мкм, хотя давно уже подчеркивалось [7], что «не существует строгой разделительной линии между наночастицами и не наночастицами. Размер, при котором материалы проявляют свойства, отличные от их свойств в массе, зависят от того, о каком материале речь, и на это определённо могут претендовать также те, размеры которых превышают 100 нм».

Как известно, при высокотемпературных металлургических и сварочных технологиях в воздух рабочих помещений выделяются аэрозоли конденсации металлов и, главным образом, их оксидов, в дисперсном составе которых преобладают субмикронные частицы. Значительная фракция этих частиц может быть отнесена к НЧ, наряду с частицами, измеряемыми сотнями нанометров. Подобная ситуация характерна, в частности, для плавки и разлива меди (рис. 1), что и послужило поводом к проведению данного исследования.

Недавно мы [8] показали, что при повторных внутрибрюшных введениях на протяжении 7 недель суспензии сферических частиц оксида меди диаметром 20 нм развиваются многие функциональные, биохимические и гистопатологические признаки субхронической медной интоксикации, а также полиорганная фрагментация ДНК (ПДАФ тест). В литературе немало данных [9–18] о том, что медные и меднооксидные НЧ обладают высокой цито- и генотоксичностью, но преобладают оценки *in vitro* на культурах клеток различных стабильных линий. Напротив, в наших исследованиях [3–6, 18] цитотоксичность наночастиц магнетита ( $Fe_3O_4$ ), серебра и золота и активность ключевого защитного механизма, каким является реакция фагоцитоза отложившихся в ды-

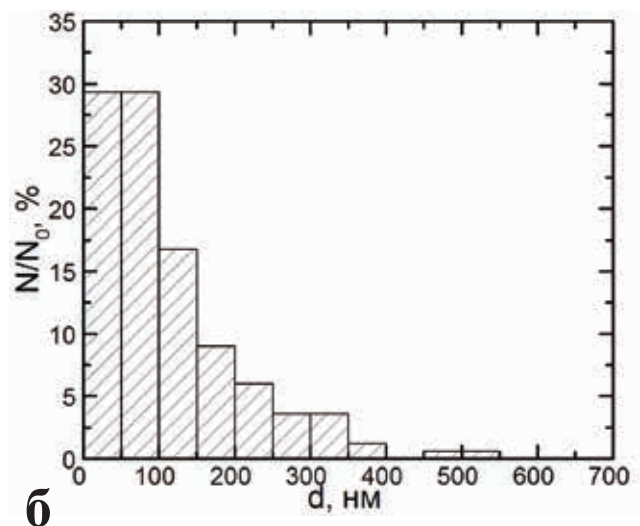
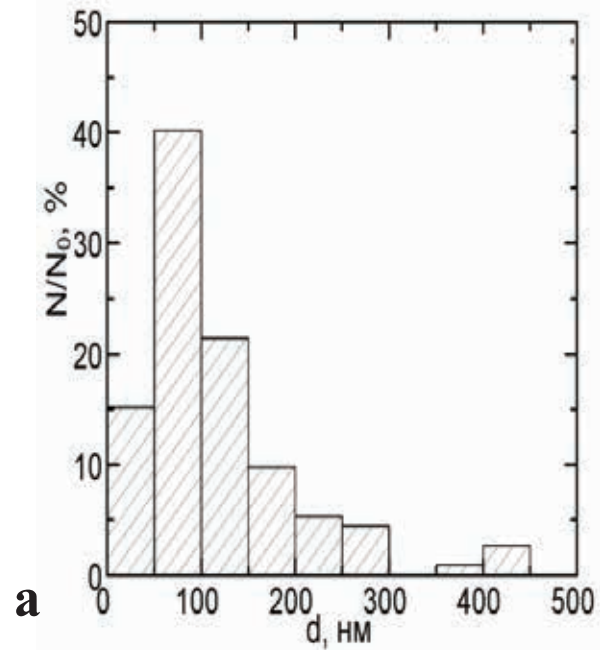


Рис. 1. Процентное распределение по диаметрам частиц субмикронного диапазона на поликарбонатных фильтрах, через которые был протянут воздух на рабочих местах при разливе (а) анодной и (б) катодной меди (N – число частиц данного диаметра, N<sub>0</sub> – общее число измеренных частиц).

хательных путях частиц, были оценены *in vivo* по изменениям свободной клеточной популяции глубоких дыхательных путей после однократной интратрахеальной инстилляцией этих материалов. Эта же методология была применена в данном исследовании, проведенном со специально приготовленными медьсодержащими частицами, моделирующими субмикронную и нанодиапазон промышленной аэрозолей, образующихся при плавке и разливе меди.

**Материалы и методы.** Для интратрахеального введения использовались специально приготовленные суспензии. Сферические НЧ со средним ( $\pm\sigma$

) диаметром  $20 \pm 10$  нм были получены лазерной обработкой поверхности медной пластины чистотой 99,99% в стерильной деионизированной воде. Судя по результатам рентгеновского энергодисперсионного анализа, в составе этих НЧ атомное соотношение  $\text{Cu}:\text{O}$  близко к 1:1.

Суспензия сферических субмикронных частиц (СМЧ) со средним ( $\pm\sigma$ ) диаметром  $340 \pm 168$  нм была получена из водной взвеси порошка, образовавшегося при электрическом взрыве медной проволоки той же чистоты. С помощью рентгеновского энергодисперсионного анализа найдено, что в поверхностном слое СМЧ, имеющем толщину около 80 нм, атомное соотношение  $\text{Cu}:\text{O}$  соответствует оксиду меди (I) ( $\text{Cu}_2\text{O}$ ), а ядро этой частицы образовано элементной медью (Cu).

Обе суспензии на деионизированной воде высоко стабильны, но при добавлении к ним физраствора или жидкости, полученной при бронхоальвеолярном лаваже (БАЛЖ) интактных крыс (в объемном отношении 1:3), за 24 часа СМЧ теряют растворяющийся оксидный слой, а НЧ растворялись практически полностью уже за 90 мин.

Эксперимент был проведен на аутбредных белых крысах-самках весом 150–220 г по 12 особей в каждой подопытной и контрольной группе. БАЛЖ получали через 24 часа после интратрахеального введения 1 мл суспензии НЧ или СМЧ (по 0,5 мг) или воды, на которой они готовились. После подсчета меланжерным способом общей клеточности в аликвотной пробе БАЛЖ отцентрифугированный клеточный осадок использовался: (а) для приготовления мазков, окрашиваемых по Гимза-Романовскому, в которых производился дифференциальный подсчет клеток при оптической микроскопии с иммерсией; (б) для изучения топографии поверхности клеток при полуконтактной атомно-силовой микроскопии или (в) для просвечивающей электронной

микроскопии (ПЭМ). Техника этих исследований детально описывалась нами ранее [5,18,19].

**Результаты и обсуждение.** Данные оптической микроскопии, представленные в таблице 1, свидетельствуют о том, что как НЧ, так и СМЧ, отложившиеся в глубоких дыхательных путях, вызывают резкое увеличение (по сравнению с контрольной БАЛЖ) абсолютного числа нейтрофильных лейкоцитов (НЛ) и менее выраженное, но тоже статистически значимое увеличение числа альвеолярных макрофагов (АМ) при существенном увеличении численного отношения НЛ/АМ, которое после введения НЧ значительно выше, чем после введения СМЧ.

Мобилизация фагоцитирующих клеток в глубокие дыхательные пути, отражаемая увеличением клеточности БАЛЖ, является типичной реакцией на отложение в них каких бы то ни было частиц. Однако и общее число клеток, и в особенности сдвиг в сторону преимущественной мобилизации НЛ тем более выражены, чем интенсивнее повреждающее действие частиц на АМ, являющееся проявлением их цитотоксичности [20–22].

Такая зависимость определяется многоуровневым стимулирующим действием продуктов разрушения макрофага (ПРМ) на гранулоцито-моноцитопоз, аттракцию НЛ и АМ и функциональную активность обоих типов клеток [23]. Однако мобилизация АМ нарастает с увеличением дозы ПРМ менее круто, чем мобилизация НЛ [20, 21]. Поэтому если баланс между разрушением АМ под действием частиц и компенсаторной мобилизацией НЛ всегда положительный, то над мобилизацией новых АМ разрушение АМ при действии особо цитотоксичных частиц может превалировать. Поэтому число АМ в БАЛЖ обычно повышено в меньшей степени, чем число НЛ либо не повышено вообще. Это отражается повышением показателя НЛ/АМ, который в целом оказыва-

Таблица 1

**Число клеток в жидкости бронхо-альвеолярного лаважа, проведенного через 24 часа после интратрахеального введения 1 мл стерильной деионизированной воды или водной суспензии, содержащей 0,5 мг медьсодержащих частиц ( $x \pm Sx$ ).**

Введено:	число клеток ( $\times 10^6$ )			НЛ/АМ
	всех	нейтрофильных лейкоцитов (НЛ)	альвеолярных макрофагов (АМ)	
Наночастицы (НЧ)	12,42 $\pm$ 1,89*	9,8 $\pm$ 2,16*	2,44 $\pm$ 0,38*	4,76 $\pm$ 1,39*
Субмикронные частицы (СМЧ)	6,79 $\pm$ 1,28*	3,64 $\pm$ 0,90*	3,06 $\pm$ 0,86*	1,39 $\pm$ 0,16*
Вода (контроль)	1,06 $\pm$ 0,14	0,052 $\pm$ 0,01	0,95 $\pm$ 0,18	0,06 $\pm$ 0,01

Примечание: \* – статистически значимое отличие от контрольной группы, ● – от группы, получившей СМЧ ( $p < 0.05$  по t-Стьюдента).

ется информативным критерием цитотоксичности отложившихся частиц.

Таким образом, судя по данным таблицы 1, медьсодержащие НЧ гораздо более цитотоксичны, чем СМЧ. Ранее в экспериментах с частицами магнетита, серебра и золота [3–6, 18] мы показали, используя те же критерии цитотоксичности, что при совпадающем химическом составе она (как и многие показатели системной токсичности) нарастает с уменьшением размера частицы, а при совпадающем размере зависит от химической природы частицы. Различие же по цитотоксичности между медьсодержащими НЧ и СМЧ, по-видимому, зависит от обеих причин. Отметим, что производной характеристикой частицы, зависящей как от ее размера, так и от химической природы, является растворимость. Растворение НЧ в модельной биологической среде *in vitro* выше растворимости СМЧ, а это различие важно в свете активной литературной дискуссии по вопросу о том, определяется ли высокая цитотоксичность меднооксидных НЧ их прямым действием на клетку или преимущественно внутриклеточным релизом  $\text{Cu}^{2+}$ -иона [10–13, 16].

Однако мы считаем важными оба механизма, поскольку в пользу проникновения внутрь фагоцита персистирующих меднооксидных НЧ и повреждения ими клеточных органелл говорят другие наши результаты, полученные с помощью полуконтактной атомно-силовой (пк-АСМ) и просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ).

При пак-АСМ клеток БАЛЖ у крыс, которым были введены оба типа частиц, обнаружено, что их поверхность, в отличие от поверхности клеток контрольных крыс, испещрена микроямками, число которых при воздействии НЧ явно больше, а преобладающие размеры – меньше, чем при воздействии СМЧ. Эта визуальная оценка (рис. 2) подтверждается статистической. Средний диаметр ямки ( $\pm s_x$ ) равен  $25,2 \pm 0,9$  нм в случае воздействия НЧ и  $290 \pm 14$  нм в случае воздействия СМЧ, а среднее число ямок на единицу поверхности ( $\text{мкм}^2$ ) равно  $74,40 \pm 3,72$  и всего  $1,85 \pm 0,09$  соответственно.

Воспроизводимость этого впервые описанного нами [3] в 2010 году эффекта в последующих экспериментах со всеми исследованными наночастицами убеждает в его неслучайности. Вероятнее всего, каждая микроямка представляет собой след той инвагинации клеточной (плазматической) мембраны, с которой начинается эндоцитоз (фагоцитоз) – процесс активного поглощения частицы фагоцитом. Число таких ямок является, таким образом, показателем фагоцитарной активности единичной клетки. То, что эта активность тем выше, чем выше цитотоксичность частиц (благодаря их меньшему размеру и/или химической природе), в случае магнетита было показано также подсчетом частиц внутри АМ и НЛ [5]. Такая зависимость между цитотоксичностью частицы и жадностью ее поглощения может быть объ-

яснена активацией фагоцита под влиянием ПРМ, что было ранее доказано в эксперименте *in vitro* с полистирольными бусинками диаметром 1 мкм [23].

Через полтора часа после добавления супернатанта БАЛЖ к высоко стабильной водной суспензии меднооксидных НЧ их не удается обнаружить методом оптического поглощения, что свидетельствует о практически полном растворении этих НЧ. Между тем картина, получаемая при пак-АСМ, свидетельствует о наличии фагоцитируемых (то есть еще не растворившихся) НЧ на свободной поверхности глубоких дыхательных путей даже через 24 часа после отложения этих частиц. Таким образом, в реальной жидкой среде *in vivo* быстрого и полного растворения этих НЧ явно не происходит.

Наличие таких персистирующих НЧ *внутри* АМ и НЛ через 24 часа после интратрахеального введения (к которым следует добавить около 1,5 ч после получения БАЛЖ до момента фиксации клеточного осадка глутаральдегидом) прямо демонстрируют данные ПЭМ. Однако их значение состоит в оценке не только внутриклеточной локализации частиц, но и вызываемых ими ультраструктурных повреждений фагоцитирующих клеток. Судя по многочисленным данным, обобщенным в обширном обзоре [24], мишенями цитотоксического действия различных наночастиц оказываются: клеточная мембрана (Ag, Au, CeO SiO<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub>, оксид железа, квантовые точки), ядро (Ag, Au, CeO SiO<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub>, ZnO), митохондрии (Ag, SiO<sub>2</sub>, ZnO), лизосомы (CeO TiO<sub>2</sub>, ZnO), эндоплазматический ретикулум (Ag, SiO<sub>2</sub>), цитоскелет (Ag, Au, CeO SiO<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub>, квантовые точки), а возможно, и аппарат Гольджи (TiO<sub>2</sub>, оксид железа). Для каждого вида НЧ обычно описываются различные точки приложения действия, однако следует подчеркнуть, что приведенное перечисление не является исчерпывающим. Наши эксперименты с наноксидом железа (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) [19], наносеребром и нанозолотом [18] выявили повреждение ядерной мембраны и особенно – митохондрий. Отметим, что в обзоре [24] медьсодержащие НЧ вообще не упоминаются. Между тем нами при электронной микроскопии как АМ, так и НЛ выраженные ультраструктурные повреждения клетки (в особенности митохондрий, а также клеточной и ядерной мембран) наблюдаются даже при обнаружении в ней очень небольшого числа частиц, что иллюстрируется рисунком 3.

Повреждение митохондрий может отражать развитие «оксидативного взрыва», что согласуется с мнением многих авторов об образовании свободных кислородных радикалов как важном механизме цитотоксичности металлосодержащих, в том числе меднооксидных НЧ (например [9, 24]).

Показателем цитотоксического повреждения фагоцитирующих клеток частицами, наряду с цитологическими данными, являются также некоторые внеклеточные биохимические характеристики БАЛЖ. Так, например, существенные различия динамики

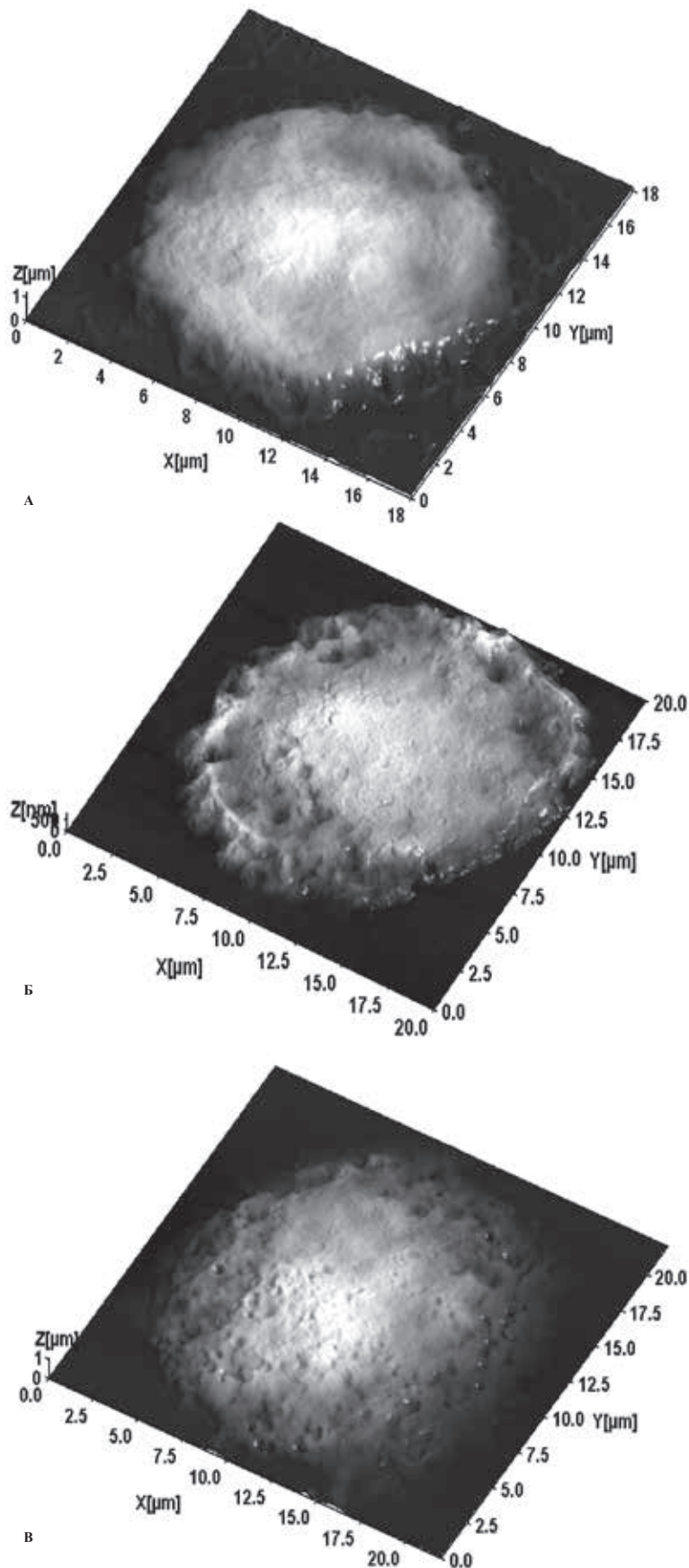


Рис. 2. Визуализация с помощью полужонктовой атомно-силовой микроскопии топографии поверхности альвеолярного макрофага контрольной крысы (А) и после интратрахеального введения СМЧ (Б) или НЧ (В).

содержания лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы наблюдались при хронической ингаляции пыли кварца, асбеста и диоксида титана [25]. Активность ЛДГ в БАЛЖ через 24 часа после интратрахеального введения частиц высоко цитотоксичного стандартного кварца DQ12 также была повышена в большей степени, чем после введения наночастиц TiO<sub>2</sub>, но в гораздо меньшей, чем после введения наночастиц кобальта и особенно никеля [26]. В другом эксперименте эти же исследователи [27] нашли, что через 3 дня после интратрахеального введения никелевых частиц диаметром 20 нм существенно большее повышение концентрации ЛДГ (а также общего белка и фактора некроза опухоли – альфа) по сравнению с контролем, чем после введения частиц Ni диаметром 5 мкм. Повышение концентрации лизосомальных ферментов обычно объясняют их релизом в результате повреждения частицами фаголизосом макрофага, а также эпителиальных клеток. Как видно из наших данных, приведенных в таблице 2, при действии медьсодержащих частиц наряду с повышением концентрации ЛДГ была повышена концентрация двух других лизосомальных ферментов (амилазы и глутамилтрансферазы), которое может получить аналогичное объяснение.

Как видно из той же таблицы, статистически значимое отличие от контрольных величин при воздействии НЧ наблюдалось также по ряду других показателей, в то время как при воздействии субмикронных МЧ соответствующие сдвиги либо отсутствовали, либо были менее выражены (как правило, при достаточной статистической значимости межгрупповых различий) [1].

Причиной всех этих сдвигов, кроме цитотоксического действия, вероятно, могут быть вызываемые медью, в том числе переходящей в раствор в ионной форме, острые воспалительные изменения легочной ткани и связанное с ними повышение проницаемости сосудов. О втором механизме наиболее убедительно свидетельствует повышение концентрации всех 4 измеренных катионов, и тот же механизм повышения концентрации в БАЛЖ наиболее вероятен для глюкозы, мочевины, мочевой кислоты.

Вместе с тем неравное повышение активности аминотрансфераз (АлТ и в еще большей степени АсТ), которое сопровождается повышением соотношения

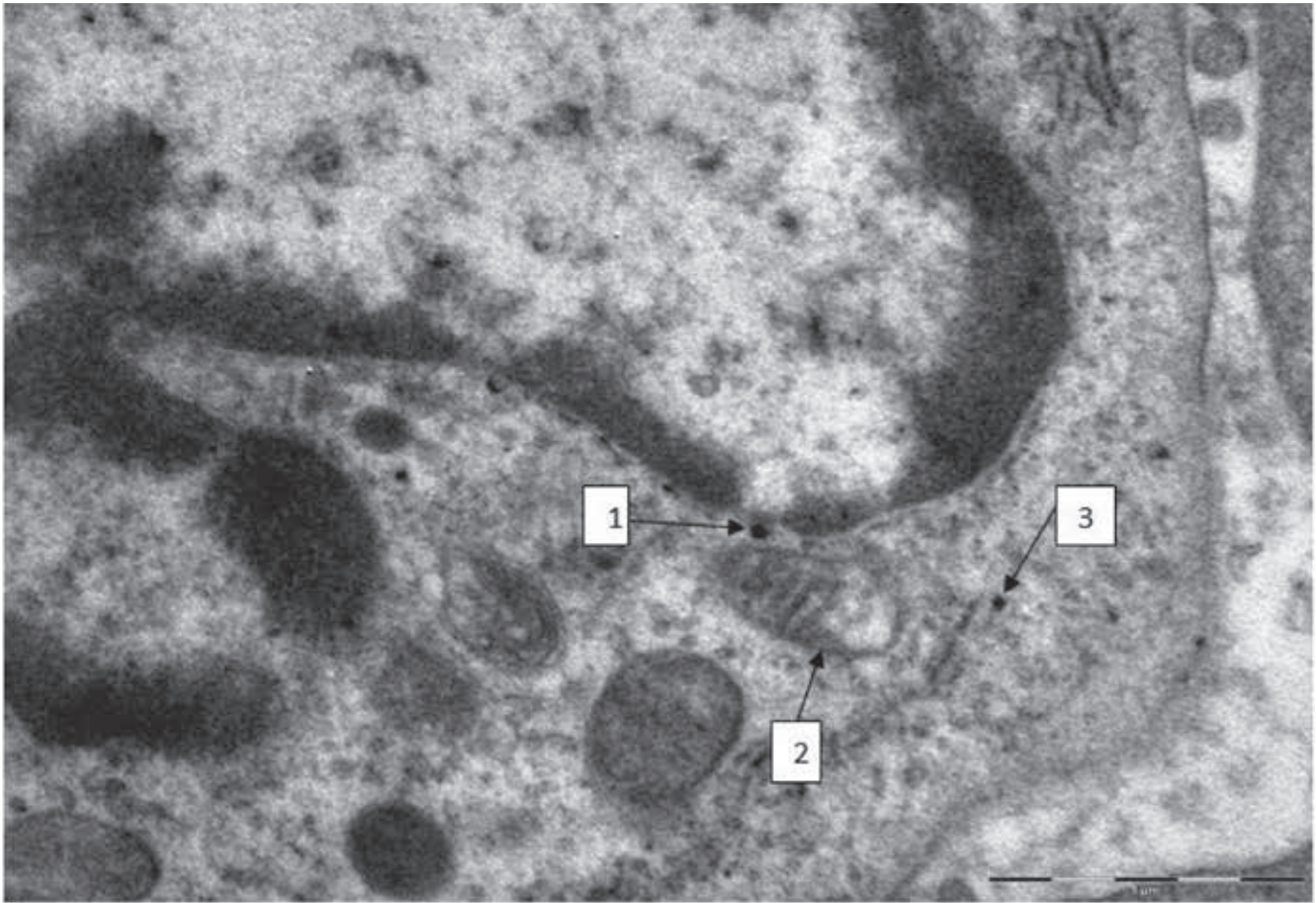


Рис. 3. Альвеолярный макрофаг из БАЛЖ крысы, получившей НЧ оксида меди (ПЭМ, увеличение  $\times 22\,000$ ). Одиночная НЧ вблизи ядерной мембраны альвеолярного макрофага (стрелка 1). Отмечается нечеткость мембраны, нарушение ее двухконтурности в зоне локализации частицы. У митохондрии около этой частицы (стрелка 2) видно частичное отсутствие крист и просветление митохондриального матрикса, оставшиеся кристы имеют признаки деструкции, а митохондриальная мембрана нечеткая, прерывистая, местами потерявшая двухконтурность. Одиночная наночастица внутри другой, почти полностью разрушенной митохондрии (стрелка 3).

между ними (коэффициента де Ритиса), возможно, связано с повреждением легочной ткани, в клетках которой, как известно, эти ферменты обнаруживаются.

**Заключение.** Присутствие в составе аэрозолей, загрязняющих воздух рабочих помещений при высокотемпературных металлургических технологиях (в частности, при плавке и разливке меди) субмикронных частиц, не только относящихся к условленному нанодиапазону, но и имеющих размеры свыше 100 нм, делает важной сравнительную оценку действия таких частиц на организм. Результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что субмикронные и в особенности наночастицы вызывают при отложении в глубоких дыхательных путях активную защитную реакцию мобилизации альвеолярных макрофагов (АМ) и в еще большей степени – нейтрофильных лейкоцитов (НЛ). Эти клетки обладают высокой фагоцитарной активностью по отношению к субмикронным частицам, но в еще

большей степени – к наночастицам. В то же время последние вызывают более существенное увеличение численного отношения НЛ/АМ, что (наряду с биохимическими сдвигами в жидкости бронхо-альвеолярного лаважа) свидетельствует об их более высокой цитотоксичности и, вероятно, большей токсичности для легочной ткани в целом (пульмоноцитоксичности).

Мы полагаем, что цитотоксический эффект лишь отчасти может быть связан с действием иона меди, образующегося при растворении частиц (которое в случае наночастиц происходит более интенсивно), поскольку при электронной микроскопии видна явная связь ультраструктурных повреждений клетки с внутриклеточной локализацией персистирующих частиц. В частности, выраженное повреждение митохондрий согласуется с распространенными представлениями о роли кислородного взрыва как важного механизма цитотоксического действия металлических, в том числе медьсодержащих наноча-

**Некоторые биохимические характеристики жидкости, полученной при бронхоальвеолярном лаваже (БАЛЖ) у крыс через 24 часа после интратрахеального введения 0,5 мг медьсодержащих нано- или субмикронных частиц в 1 мл водной суспензии ( $\bar{x} \pm Sx$ )<sup>1)</sup>**

Показатели	Группы крыс, получившие:		
	воду (контроль)	наночастицы	субмикронные частицы
Глюкоза, ммоль/л	0,56±0,00	1,36±0,25*	0,56±0,00
Азот мочевины, ммоль/л	0,36±0,00	0,68±0,10*	0,36±0,00
Мочевая кислота, мкмоль/л	14,67±0,33	16,75±0,50*	14,25±0,25
Амилаза, мкмоль/л·мин.	30,00±0,00	140,25±3,50*	30,00±0,00
АлТ, мкмоль/л·мин.	21,33±0,67	25,25±0,29*	22,00±0,41
АсТ, мкмоль/л·мин.	7,33±1,20	39,75±2,29*	19,50±1,66*
Коэффициент де Ритиса	0,34±0,05	1,57±0,08*	0,88±0,07*
Глютамилтрансфераза, мкмоль/л·мин	5,33±0,33	14,50±0,87*	10,25±0,63*
Лактатдегидрогеназа, мкмоль/л·мин.	166,67±30,33	821,50±9,50*	601,75±54,65*
Кальций, ммоль/л	0,12±0,00	0,25±0,02*	0,12±0,00
Магний, ммоль/л	0,12±0,00	0,16±0,01*	0,12±0,00
Фосфор, ммоль/л	0,14±0,01	0,25±0,02*	0,14±0,00
Железо, мкмоль/л	0,40±0,00	0,83±0,21*	0,40±0,00

Примечание: \* – статистически значимое отличие от контрольной группы, ● – от группы, получившей СМЧ ( $p < 0,05$  по t-критерию).

<sup>1)</sup> В таблицу 2 не включены показатели, по которым не было отличий от контроля (общий белок, альбумин, креатин, креатинкиназа, липаза), а также щелочная фосфатаза, повышение содержания которой было статистически недостаточно значимым.

СТИЦ.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/ REFERENCES:

1. Warheit D.B., Reed K.L., Sayes C.M. A role of surface reactivity in TiO<sub>2</sub> and quartz-related nanoparticle pulmonary toxicity. *Nanotoxicology*. 2009; 3: 181–187.
2. Donaldson K., Stone V., Tran C.K., Kreyling W., Borm P.J. *Nanotoxicology* (editorial). *Occup Environ Med*. 2004; 61: 727–728.
3. Katsnelson B.A., Privalova L.I., Kuzmin S.V., Degtyareva T.D., Sutunkova M.P., Yermenko O.S., Minigaliev I.A., Kireyeva E.P., Khodos M.Y., Kozitsina A.N. et al. Some peculiarities of pulmonary clearance mechanisms in rats after intratracheal instillation of magnetite (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) suspensions with different particle sizes in the nanometer and micrometer ranges: Are we defenseless against nanoparticles? *Int. J. Occup. Environ. Health*. 2010; 16: 508–524.
4. Katsnelson B.A., Privalova L.I., Degtyareva T.D., Sutunkova M.P., Yermenko O.S., Minigaliev I.A., Kireyeva E.P., Kozitsina A.N., Malakhova N.A., Glazyrina J.A. et al. Experimental estimates of the toxicity of iron oxide Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (magnetite) nanoparticles. *Cent. Eur. J. Occup. Environ. Med*. 2010; 16: 47–63.
5. Katsnelson B.A., Privalova L.I., Sutunkova M.P., Tulakina L.G., Pichugova S.V., Beikin J.B., Khodos M.Y. The «in vivo» interaction between iron oxide Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles and alveolar macrophages. *Bull. Exp. Biol. Med*. 2012; 152: 627–631.
6. Katsnelson B.A., Privalova L.I., Gurvich V.B., Makeyev O.H., Shur V.Y., Beikin J.B., Sutunkova M.P., Kireyeva E.P., Minigaliev I.A., Loginova N.V. et al. Comparative in vivo assessment of some adverse bio-effects of equidimensional gold and silver nanoparticles and the attenuation of nanosilver's effects with a complex of innocuous bioprotectors. *Int. J. Mol. Sci*. 2013; 14: 2449–2483.
7. Bastus N.G., Casals E., Socorro V.-C., Puentes V. Reactivity of engineered inorganic nanoparticles and carbon nanostructures in biological media. *Nanotoxicology*. 2008; 2: 99–112.
8. Karlsson H.L., Cronholm P., Gustafsson J., Möller L. Copper oxide nanoparticles are highly toxic: A comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes. *Chem. Res. Toxicol*. 2008; 21: 1726–1732.
9. Xu J., Li Z., Xu P., Xiao L., Yang Z. Nanosized copper oxide induces apoptosis through oxidative stress in podocytes. *Arch. Toxicol*. 2013; 87: 1067–1073.
10. Bondarenko O., Ivask A., Käkinen A., Kahru A. Sub-toxic effects of CuO nanoparticles on bacteria: kinetics, role of Cu ions and possible mechanisms of action. *Environ. Pollut*. 2012; 169: 81–89.
11. Pang C., Selck H., Misra S.K., Berhanu D., Dybowska A., Valsami-Jones E., Forbes V.E. Effects of sediment-associated copper to the deposit-feeding snail, *Potamopyrgus antipodarum*: A comparison of Cu added in aqueous form or as nano- and micro-CuO particles. *Aquat. Toxicol*. 2012; 15: 114–122.
12. Studer A.M., Limbach L.K., van Duc L., Krumeich F., Athanassiou E.K., Gerber L.C., Moch H., Stark W.J. Nanoparticle cytotoxicity depends on intracellular solubility: Comparison of stabilized copper metal and degradable copper oxide nanoparticles. *Toxicol. Lett*. 2010; 1: 169–174.
13. Cronholm P., Karlsson H.L., Hedberg J., Lowe T.A., Winberg L., Elihn K., Wallinder I.O., Möller L. Intracellular uptake and toxicity of Ag and CuO nanoparticles: A comparison between nanoparticles and their corresponding metal ions. *Small*. 2013; 8: 970–982.
14. Cuillel M., Chevillet M., Charbonnier P., Fauquant C., Pignot-Paintrand I., Arnaud J., Cassio D., Michaud-Soret I., Mintz E. Interference of CuO nanoparticles with metal homeostasis in hepatocytes under sub-toxic conditions. *Nanoscale*. 2014; 16: 1707–1715.
15. Chen Z., Meng H., Xing G., Chen C., Zhao Y., Jia G., Wang T., Yuan H., Ye C., Zhao F. et al. Acute toxicological effects of copper nanoparticles in vivo. *Toxicol. Lett*. 2006; 25: 109–120.
16. Limbach L.K., Studer A.M., Van Duc L. et al. Nanoparticle cytotoxicity depends on intracellular solubility: comparison of stabilized copper metal and degradable copper oxide nanoparticles. *Toxicol. Lett*. 2010; 197(3): 169–174.
17. Alarfi S., Ali D., Verma A., Alakhtani S., Ali B.A. Cytotoxicity and genotoxicity of copper oxide nanoparticles in human skin keratinocytes cells. *Int. J. Toxicol*. 2013; 32: 296–307.
18. Privalova L.I., Katsnelson B.A., Loginova N.V., Gurvich V.B., Shur V.Y., Valamina I.E. et al. Subchronic toxicity of copper oxide nanoparticles and its attenuation with the help of a combination of bioprotectors. *Int J Mol Sci*. 2014; 15: 12379–12406.
19. Privalova L.I., Katsnelson B.A., Osipenko A.B., Yushkov B.H., Babushkina L.G. Response of a phagocyte cell system to products of macrophage breakdown as a probable mechanism of alveolar phagocytosis adaptation to deposition of particles of different cytotoxicity. *Environm. Health Perspect*. 1980; 35: 205–218.
20. Katsnelson B.A., Privalova L.I. Recruitment of phagocytizing cells into the respiratory tract as a response to the cytotoxic action of deposited particles. *Environ Health Perspect*. 1984; 55: 313–325.
21. Katsnelson B.A., Konyshova L.K., Privalova L.Y., Sharapova N.Y. Quartz dust retention in rat lungs under chronic exposure simulated by a multicompartmental model: Further evidence of the key role of the cytotoxicity of quartz particles. *Inhalat Toxicol*. 1997; 9: 703–715.
22. Privalova L.I., Katsnelson B.A., Sharapova N.Y., Kisilitsina N.S. On the relationship between activation and the breakdown of macrophages in pathogenesis of silicosis. *Med. Lav*. 1995; 86: 511–521.
23. Fröhlich E. Cellular targets and mechanisms in the cytotoxic action of non-biodegradable engineered nanoparticles. *J. Curr. Drug. Metab*. 2013; 14: 976–988.
24. Donaldson K., Bolton R., Jones E.A., Brown G. M., Robertson M.D., Slight J., Cowie H., Davis J. M. G. Kinetics of the bronchoalveolar leucocyte response in rats during exposure to equal airborne mass concentrations of quartz, chrysotile asbestos, or titanium dioxide. *Thorax*. 1988; 43: 525–533.
25. Zhang Q., Yukinori K., Sato K., Nakakuki K., Koyahama N., Donaldson K. Differences in the extent of inflammation caused by intratracheal exposure to three ultrafine metals: role of free radicals. *J. Toxicol. and Environmental Health*. 1998; 53: 423–438.
26. Zhang Q., Yukinori K., Zhu X., Sato K., Mo Y., Klutz T., Donaldson K. Comparative toxicity of standard nickel and ultrafine nickel after intratracheal instillation. *J. Occup. Health*. 2003; 45: 23–30.

L.I. Privalova<sup>1</sup>, B.A. Katsnelson<sup>1</sup>, N.V. Loginova<sup>1</sup>, V.B. Gurvich<sup>1</sup>, V. Ya. Shur<sup>2</sup>, Ya.B. Beikin<sup>3</sup>, M. P. Sutunkova<sup>1</sup>, I.A. Minigaliev<sup>1</sup>, E.V. Shishkina<sup>2</sup>, S. V. Pichugova<sup>3</sup>, L. G. Tulakina<sup>3</sup>, S.V. Beljajeva<sup>3</sup>, V. O. Rusakov<sup>1</sup>.

## CYTOTOLOGICAL AND BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF BRONCHOALVEOLAR LAVAGE FLUID IN RATS AFTER INTRATRACHEAL INSTILLATION OF COPPER OXIDE NANO-SCALE PARTICLES

<sup>1</sup>Ekaterinburg Medical Research Center for Prophylaxis and Health Protection of Industrial Workers, 620014, Ekaterinburg, Russian Federation  
<sup>2</sup>The Centre for collective use «Modern Nanotechnologies», Ural Federal University, 620000, Ekaterinburg, Russian Federation  
<sup>3</sup>The City Clinical Diagnostics Centre, 620142 Ekaterinburg, Russian Federation

Stable water suspensions of copper oxide particles with the mean diameter of 20 nm and copper oxide-copper ones with the mean diameter of 340 nm were used to assess the rats pulmonary phagocytosis response to a single intratracheal instillation of 0.5 mg(1 ml) of these suspensions followed by the bronchoalveolar lavage after 24 hours with the help of optical, transmission electron, and semi-contact atomic force microscopy and a number of biochemical indices measured in the bronchoalveolar lavage fluid. It was found out that the two fractions produce an expressed toxic effect on lungs but nanoparticles appear significantly more toxic than sub-micron particles greater than 100 nm in size while the former evokes a more pronounced defense recruitment of alveolar macrophages and especially of neutrophil leukocytes at a higher phagocytosis activity of these cells. Results obtained compared to literature data show that a high cytotoxic action of nanometer copper oxide particles may be caused both by a copper ions intracellular release at solubilization and direct contact of persistent particles internalized by phagocytes with cell organelles (primarily, mitochondria) and their injuries as well.

**Key words:** ultrafine copper-containing particles, bronchoalveolar lavage, cytotoxicity.

Материал поступил в редакцию 13.08.2014 г.

# АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНА *Bche* С АКТИВНОСТЬЮ БУТИРИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ КРЫС ПОСЛЕ ОТРАВЛЕНИЯ МАЛАТИОНОМ

А.В. Бабкин<sup>1</sup>, И.С. Бердинских<sup>1</sup>,  
Н.С. Осечкина<sup>1</sup>, Г.В. Назаров<sup>1</sup>,  
М.А. Юдин<sup>1</sup>, В.Н. Быков<sup>1</sup>, А.М. Сарана<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательский испытательный институт военной медицины Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова, 195043, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация  
<sup>2</sup>СПб ГБУЗ «Городская больница № 40», 197706, г. Сестрорецк, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

**Н**а модели отравления крыс малатионом в дозе 1 ЛД<sub>50</sub> исследована ассоциация полиморфизмов гена *Bche* с активностью бутирилхолинэстеразы. Изучено распределение генотипов 6 полиморфных вариантов гена *Bche*. Показана достоверная ( $p < 0,05$ ) ассоциация вариантов T>C (SNPID rs198598583), G>T (SNPID rs106118718), A>T (SNPID rs107226860) с активностью бутирилхолинэстеразы в ткани печени через 1 сутки после отравления, а их распространенность характеризуется сцепленным типом наследования. Наибольшая корреляционная связь активности фермента в печени прослежена для аллельных вариантов A>T (rs107226860) и G>T (rs106118718). У крыс с гомозиготным вариантом генотипа активность фермента была достоверно больше (на 30%) по сравнению с гетерозиготным генотипом.

**Ключевые слова:** генетический полиморфизм, ген *Bche*, активность бутирилхолинэстеразы, отравление, малатион.

**Введение.** Бутирилхолинэстераза (БХЭ) выполняет многие функции в организме человека и животных: участвует в передаче нервных импульсов [1] и гидролизует избыток ацетилхолина в нервно-мышечных синапсах [2]. Изменение активности фермента наблюдается при различных патологических состояниях и, в первую очередь, заболеваниях печени, анемии, новообразованиях, кахексии и хронических инфекциях. БХЭ образует комплекс с рядом токсикантов, относящихся к классу фосфорорганических соединений (ФОС), включая пестициды (малатион, хлорпиррифос, диазинон) и отравляющие вещества (зарин, зоман, Vx) [3]. При отравлении этими ядами наблюдается выраженное снижение активности фермента [4].

При любом варианте поражения ФОС первичный контакт яда с холинэстеразой плазмы крови происходит в сосудистом русле, субстратом которой является бутирилхолин. Это обстоятельство позволяет рассматривать БХЭ в своем роде «буферной системой» между ядом и органами-мишенями. За счет такого действия БХЭ предохраняет АХЭ нервно-мышечных синапсов от ингибирования ФОС, а ее активность может служить критерием адекватности проведения терапии и исхода интоксикации ФОС [5].

До настоящего времени лечение отравлений рядом ФОС и, в первую очередь, малатионом сопряжено с недостаточной эффективностью средств антидотной терапии (атропин) и реактационной способностью дипиросима, рекомендованного для применения в гражданском

здравоохранении. Особенности протекания отравлений малатионом и недостаточный биологический отклик в ответ на прием фармакологических средств может обуславливаться полиморфизмом генов, обеспечивающих регуляцию холинергической системы. О вероятной роли генетических различий также указывают данные об индивидуальности течения интоксикации и степени ингибирования БХЭ у животных одного и того вида.

Показано, что активность БХЭ может определяться структурными особенностями гена, кодирующего наработку этого фермента. Ген *Bche* локализован на длинном плече второй хромосомы (локус 2q32) и содержит значительное число однонуклеотидных замен (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) [6]. Встречаются сведения о влиянии полиморфизма гена *Bche* на ферментативную активность БХЭ человека [7, 8, 9, 10]. В то же время влияние полиморфизма гена *Bche* на активность БХЭ, а также ее восстановление при воздействии малатионом ранее не было исследовано.

В связи с этим целью настоящей работы было исследование ассоциации полиморфных вариантов гена *Bche* белых беспородных крыс с активностью БХЭ после отравления малатионом.

**Материалы и методы исследования.** Работа выполнена в соответствии с Национальными и Международными Правилами работы с лабораторными животными, а ее выполнение санкционировано Комиссией по биоэтике (IACUC), утвержденной начальником Института от 19.11.2009

**Бабкин Александр Владимирович (Babkin Aleksandr Vladimirovich)**, научный сотрудник НИИИ ВМ ВМедА им. С.М. Кирова Министерства обороны Российской Федерации, 195043, г. Санкт-Петербург, babkinmik@yandex.ru  
**Бердинских Ирина Сергеевна (Berdinskikh Irina Sergeevna)**, научный сотрудник НИИИ ВМ ВМедА им. С.М. Кирова Министерства обороны Российской Федерации, 195043, г. Санкт-Петербург, irina\_berdinskikh@mail.ru  
**Осечкина Наталья Сергеевна (Osechkina Natalya Sergeevna)**, младший научный сотрудник НИИИ ВМ ВМедА им. С.М. Кирова Министерства обороны Российской Федерации, 195043, г. Санкт-Петербург, dunats@rambler.ru  
**Назаров Георгий Валерьевич (Nazarov Georgiy Valerevich)**, доктор химических наук, доцент, начальник отдела НИИИ ВМ ВМедА им. С.М. Кирова Министерства обороны Российской Федерации, 195043, г. Санкт-Петербург, denis-100@list.ru

**Юдин Михаил Анатольевич (Judin Mikhail Anatolevich)**, кандидат медицинских наук, доцент, заместитель начальника отдела НИИИ ВМ ВМедА им. С.М. Кирова Министерства обороны Российской Федерации, 195043, г. Санкт-Петербург, mikhaail.judin@gmail.com

**Быков Владимир Николаевич (Bykov Vladimir Nikolaevich)**, доктор медицинских наук, доцент, начальник центра НИИИ ВМ ВМедА им. С.М. Кирова Министерства обороны Российской Федерации, 195043, г. Санкт-Петербург, bykov\_im@yahoo.com

**Сарана Андрей Михайлович (Sarana Andrey Mikhailovich)**, кандидат медицинских наук, доцент, начальник отделения реабилитации СПб ГБУЗ «Городская больница № 40», г. Сестрорецк, 197706, г. Санкт-Петербург

г. Эксперименты выполнены на белых нелинейных крысах-самцах массой 180–240 г., содержащихся в условиях вивария (питомник РАМН «Рапполово», Ленинградская область). За 12 ч до начала эксперимента животных лишили пищи. Для моделирования отравления животным однократно внутривенно (в/ж) вводили малатион в дозе 1 ЛД<sub>50</sub> (410 мг/кг). В качестве антидота отравлений ФОС всем животным на первых признаках интоксикации внутримышечно вводили атропин в дозе 2 мг/кг, пересчитанной по методике межвидового переноса доз согласно «Руководства...» [11]. При экстраполяции на человека доза атропина соответствовала 20 мг/чел. (лечение тяжелых форм отравлений ФОС). Контрольной группе вводили стерильную воду для инъекций из расчета 1 мл/кг. Наблюдение за животными осуществляли в течение 1 сут.

В этот срок исследовали биохимические и генотипические маркеры интоксикации. Скорость ферментативного гидролиза бутирилтиохолин йодида (субстанции Sigma) определяли в крови, гомогенатах печени и головного мозга при температуре 37,4 °C в среде 0,04 М фосфатного буфера при pH = 7,5 в условиях постоянства концентрации субстрата (метод Элмана) [12]. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре Hitachi U-2900 при длине волны 412 нм.

Выделение ДНК осуществляли из образцов периферической крови с использованием автоматической станции для выделения нуклеиновых кислот «NorDiag Atgow» (Швеция) и коммерческого набора «Atgow Blood DNA Kit 500» (Швеция) по протоколу «DNA Blood 500». Концентрацию выделенной ДНК определяли с использованием спектрофотометра «BioSpec-папо» (Япония).

Для определения полиморфизмов гена *Bche* проводили полимеразно-цепную реакцию в реальном времени (ПЦР-РВ) на амплификаторе «QuantStudio 12K Flex», «Applied Biosystems» (США), с использованием коммерческих праймеров и зондов, нанесенных производителем на пластины «OpenAтгау». С использованием робота «OpenAтгау AccuFill System» на пластины «OpenAтгау» наносили реакционную смесь для генотипирования TaqMan® OpenAтгау® Genotyping Master Mix, деионизованную воду и образцы ДНК [13]. Термоциклирование пластин «OpenAтгау» проводили по следующей программе: 95 °C – 600 с – 1 цикл; (92 °C – 15 с, 60 °C – 60 с) – 40 циклов. При анализе данных ПЦР-РВ использовали программное обеспечение «НОМЕ Genotyper».

Статистическую обработку результатов осуществляли с использованием программы Statistica 8.0. Проверка соответствия распределения показателей активности БХЭ в печени нормальному распределению была проведена с использованием критерия Колмогорова-Смирнова. Для сравнения уровней активности БХЭ при носительстве различных генотипов использовали t-критерий Стьюдента.

**Результаты и обсуждение.** На основании информационно-теоретического поиска определен перечень вариаций гена *Bche*, ответственных за ферментативную активность БХЭ. Установлено, что частоты полиморфных вариантов гена *Bche* (SNPID rs198598583, rs106414162, rs107226860, rs106296908, rs106118718, rs105196691) оказывают наиболее выраженное влияние на активность БХЭ. Два из них расположены в экзонах (кодирующей области гена), 3 других в интронах (некодирующей части гена), а также еще 1 расположен в 3'-области гена [6]. Анализ образцов ДНК, выделенных из периферической венозной крови крыс, позволил выявить частоты полиморфных вариантов гена *Bche* (табл. 1).

У исследуемых животных показано отсутствие разнообразия среди генетических вариантов G>A (rs106414162), A>G (rs106296908), C>T (rs105196691) гена *Bche*. Следовательно, можно предположить, что данные полиморфизмы гена *Bche* не оказывают влияния на активность фермента БХЭ.

В противоположность этому полиморфизмы T>C (rs198598583), G>T (rs106118718), A>T (rs107226860) формировали различные генотипы с относительно схожими частотами. В оцениваемой выборке не наблюдали ни одного животного с гомозиготными генотипами по «диким» аллелям, что может объясняться малой частотой их представленности в популяции крыс.

Полученные данные позволили выделить три основных полиморфизма гена *Bche*, которые могут влиять на ферментативную активность БХЭ в организме крыс: T>C (rs198598583), G>T (rs106118718), A>T (rs107226860). Среди исследованной выборки животных проведен анализ ассоциации вариантов гена *Bche* с активностью БХЭ, при этом только для ткани печени показана корреляция показателей. Для всех трех вариантов полиморфизма гена *Bche* было характерно сцепленное наследование.

Результаты активности БХЭ печени в зависимости от полиморфизма гена *Bche* через 1 сут. ки после отравления крыс малатионом в дозе 1 ЛД<sub>50</sub> и терапии атропином (2 мг/кг, в/м) представлены на рисунке 1.

Для исследованных групп характерно отсутствие межгрупповых отличий по гетерозиготному или гомозиготному вариантам полиморфизма гена *Bche*. У крыс с гомозиготным вариантом генотипа, независимо от полиморфизма гена *Bche*, активность фермента была достоверно (при  $p \leq 0,05$ ) выше на 30 % по сравнению с БХЭ животных с гетерозиготным генотипом.

Особенности эстеразного статуса позволили предположить о ведущей роли гомозиготных вариантов гена *Bche* в восстановлении активности БХЭ в ткани печени на фоне ее тотального ингибирования (до 80%) малатионом в течение 1–2 ч после отравления.

Полученные данные свидетельствуют о наличии ассоциации всех трех исследованных вариантов гена *Bche* с активностью БХЭ в печени через 1 сутки после отравления крыс малатионом в дозе 1 ЛД<sub>50</sub>. По уровню статистической значимости наибольшая корреляционная связь активности БХЭ в печени прослеживалась для крыс с генотипом A>T (rs107226860) и G>T (rs106118718).

Результаты изучения особенностей протекания отравления ФОС и эстеразного статуса в зависимости от полиморфизма генотипа гена *Bche* у животных подтверждаются данными оценки зависимости полиморфизма гена, кодирующего БХЭ, с ее ферментативной активностью у человека. Так, у носителей мутации (A>G, rs1799807) активность БХЭ значительно ниже, а в ряде случаев практически не прослеживается [9]. Данный факт может быть обусловлен наработкой фермента с измененной пространственной структурой эстеразного участка. Показано, что точечная мутация (G>A, rs1803274), определяющая так называемый «К-вариант» БХЭ, приводит к снижению активности фермента в среднем до 30% от внутрипопуляционной нормы [7]. В то же время существуют варианты гена, кодирующего БХЭ человека, ассоциированного с повышенной активностью БХЭ. Так, например, у носителей «Йоханнесбургского» варианта, выявленного в южноафриканской популяции, наблюдаются более высокие показатели активности БХЭ по сравнению с общей популяцией в среднем в 2–3 раза [8]. Показано, что у лиц с вариантом БХЭ, устойчивой к ингибированию 0,05 мМ раствором фторида натрия, обнаруживались одна или две мутации в гене БХЭ (Thr271Met, rs28933389; Gly418Val rs28933390) [10].

Проведенное исследование продемонстрировало достоверную ( $p < 0,05$ ) ассоциацию вариантов T>C (rs198598583), G>T (rs106118718), A>T (rs107226860) гена *Bche* с активностью БХЭ в печени после отравления малатионом в дозе 1 ЛД<sub>50</sub> и терапии атропином (2 мг/кг, в/м). Носители гетерозиготных генотипов (CT, AT и GT соответственно) обладали более низкой ферментативной активностью БХЭ в печени через 1 сутки после введения ФОС, в сравнении с носителями гомозиготных генотипов по «диким» аллелям. Следовательно, можно предположить, что крысы с гомозиготными генотипами по «диким» аллелям должны быть более устойчивы к воздействию ФОС. Варианты гена *Bche* T>C (rs198598583) и G>T (rs106118718) предположительно наследуются сцепленно, то есть генотипу TT соответствует генотип GG. Поэтому влияние на активность БХЭ в печени через 1 сутки после отравления малатионом в дозе 1 ЛД<sub>50</sub> одного из полиморфных вариантов может объясняться влиянием второго варианта.

Эти и другие особенности генетического профиля с активностью БХЭ имеют принципиальное значение при разработке средств фармакологической коррекции поражений ФОС. Данные исследования полиморфизма гена *Bche* в острый период отравления крыс малатионом на уровень активности БХЭ позволяют сформировать новые подходы для оценки эффективности существующих средств лечения поражений ФОС, равно как и определить новые направления для разработки средств лечения, основанных на инженерной биотехнологии, используя при этом биологическую модель отравления на крысах.

**Заключение.** В ходе экспериментальных исследований установлено, что полиморфные варианты T>C (rs198598583), G>T (rs106118718), A>T (rs107226860) гена *Bche* определяют активность БХЭ в печени крыс через 1 сутки после отравления малатионом в дозе 1 ЛД<sub>50</sub>. Наибольшая корреляционная связь активности фермента в печени прослежена для аллельных вариантов A>T (rs107226860) и G>T (rs106118718) и гомозиготным вариантом генотипа.

Наличие полиморфизма в гене *Bche* обуславливает различный профиль активности БХЭ и, предположительно, различную реакцию животных одного и того вида в ответ на введение малатиона в дозе 1 ЛД<sub>50</sub>. Результаты изучения полиморфизма гена, кодирующего БХЭ после выполнения дополнительных исследований, могут быть использованы для обоснования схем применения рекомендованных средств лечения отравлений ФОС, а также разработки новых средств патогенетической терапии.

**Частота встречаемости полиморфных вариантов гена *Vsbe* у крыс после отравления малатионом в дозе 1 ЛД<sub>50</sub> и терапии атропином (2 мг/кг, в/м)**

№ п/п	Полиморфные варианты гена <i>Vsbe</i>	Частота встречаемости генотипов, N		
		NN	NM	MM
1	T>C (rs198598583)	13 (44,8)	16 (55,2)	0 (0)
2	G>A (rs106414162)	29 (100)	0 (0)	0 (0)
3	A>T (rs107226860)	12 (41,4)	17 (58,6)	0 (0)
4	A>G (rs106296908)	29 (100)	0 (0)	0 (0)
5	G>T (rs106118718)	13 (44,8)	16 (55,2)	0 (0)
6	C>T (rs105196691)	29 (100)	0 (0)	0 (0)

Примечание: 1 – NN – гомозигота по «дикому» аллелю, NM – гетерозигота, MM – гомозигота по «редкому» аллелю; 2 – в скобках указана частота встречаемости полиморфных вариантов гена *Vsbe*.

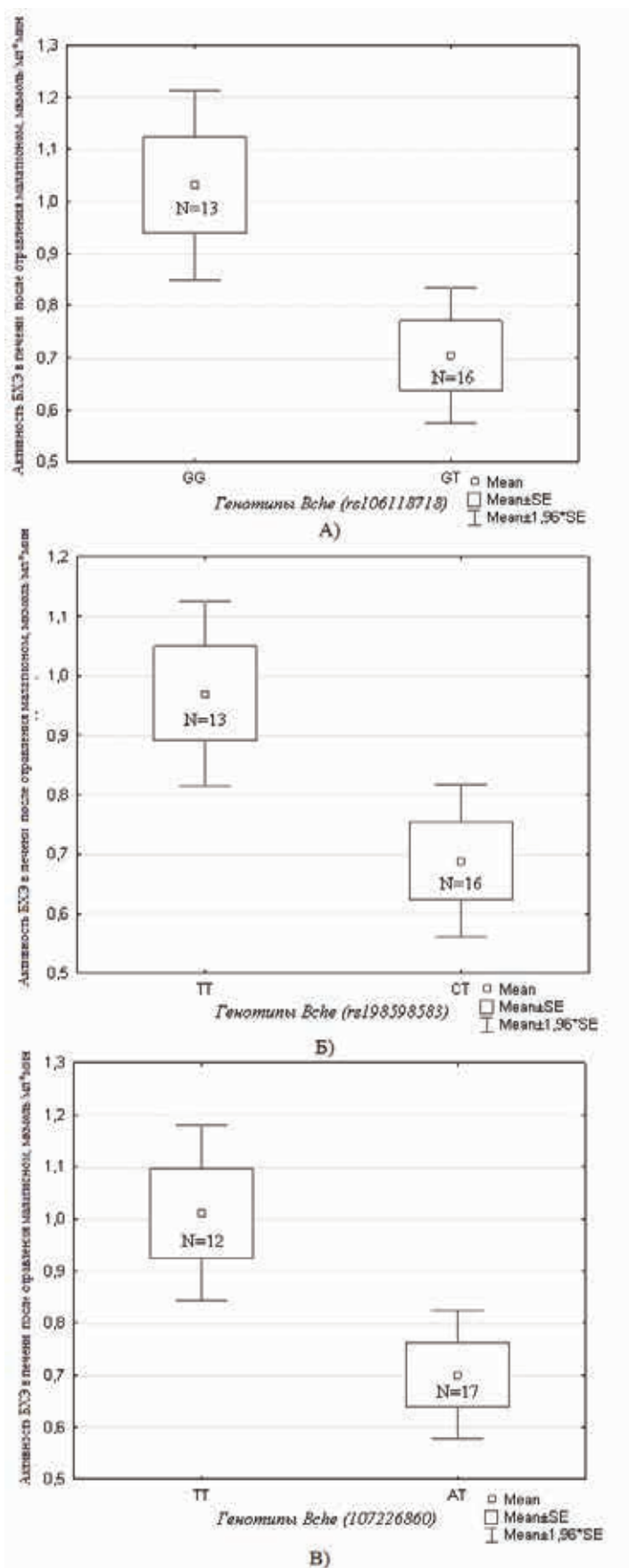


Рис. 1. Активность БХЭ в печени крыс через 1 сутки после отравления малатионом (1 ЛД<sub>50</sub>) и терапии атропином (2 мг/кг, в/л) в зависимости от полиморфизма G>T (rs106118718) (А), T>C (rs198598583) (Б), A>T (rs107226860) (В) гена CYP2D6

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Giasobini E.* Cholinesterases: new roles in brain function and in Alzheimer's disease. *Neurochem. Res.* 2003; 28: 515–522.
2. *Girard E. et al.* Butyrylcholinesterase and the control of synaptic responses in acetylcholinesterase knockout mice. *Life Sci.* 2007; 80 (24–25): 2380–2385.
3. *Broomfield C.A. et al.* Protection by butyrylcholinesterase against organophosphorus poisoning in nonhuman primates. *J Pharmacol Exp Ther.* 1991; 259 (2): 633–638.
4. *Дёгтева С.Д., Старостина В.К.* Холинэстеразы: методы анализа и диагностическое значение. *Новости «Вектор-Бест».* 2008; 1 (47): 5–7.
5. *Bajgar J. et al.* Changes of cholinesterase activities in the rat blood and brain after sarin intoxication pretreated with butyrylcholinesterase. *Drug Chem. Toxicol.* 2007; 30 (4): 351–359.
6. SNP of *Bche* gene. Available at: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp?LinkName=gene\\_snp&from\\_uid=65036](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp?LinkName=gene_snp&from_uid=65036) (accessed 1 May 2014).
7. *Bartels C. F. et al.* DNA mutation associated with the human butyrylcholinesterase K-variant and its linkage to the atypical variant mutation and other polymorphic sites. *Am. J. Hum. Genet.* 1992; 50: 1086–1103.
8. *Krause A., Lane A.B., Jenkins T.A.* A new high activity plasma cholinesterase variant. *J Med Genet.* 1988; 25(10): 677–681.
9. *McGuire M. C. et al.* Identification of the structural mutation responsible for the dibucaine-resistant (atypical) variant form of human serum cholinesterase. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1989; 86: 953–957.
10. *Nogueira C. P. et al.* Identification of two different point mutations associated with the fluoride-resistant phenotype for human butyrylcholinesterase. *Am. J. Hum. Genet.* 1992; 51: 821–828.
11. *Миронов А.Н.* Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М., 2012.
12. *Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V. Jr., Featherstone R.M.* A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 1961; 7: 88–95.
13. *TaqMan® OpenArray® Genotyping. Getting Started Guide (2010).* Available at: [http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cms\\_058198.pdf](http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cms_058198.pdf) (accessed 1 May 2014).

## REFERENCES:

1. *Giasobini E.* Cholinesterases: new roles in brain function and in Alzheimer's disease. *Neurochem. Res.* 2003; 28: 515–522.
2. *Girard E. et al.* Butyrylcholinesterase and the control of synaptic responses in acetylcholinesterase knockout mice. *Life Sci.* 2007; 80 (24–25): 2380–2385.
3. *Broomfield C.A. et al.* Protection by butyrylcholinesterase against organophosphorus poisoning in nonhuman primates. *J Pharmacol Exp Ther.* 1991; 259 (2): 633–638.
4. *Djogteva S.D., Starostina V.K.* Cholinesterase: methods of analysis and diagnostic importance. *Novosti «Vektor-Best».* 2008; 1 (47): 5–7 (in Russian).
5. *Bajgar J. et al.* Changes of cholinesterase activities in the rat blood and brain after sarin intoxication pretreated with butyrylcholinesterase. *Drug Chem. Toxicol.* 2007; 30 (4): 351–359.
6. SNP of *Bche* gene. Available at: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp?LinkName=gene\\_snp&from\\_uid=65036](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp?LinkName=gene_snp&from_uid=65036) (accessed 1 May 2014).
7. *Bartels C. F. et al.* DNA mutation associated with the human butyrylcholinesterase K-variant and its linkage to the atypical variant mutation and other polymorphic sites. *Am. J. Hum. Genet.* 1992; 50: 1086–1103.
8. *Krause A., Lane A.B., Jenkins T.A.* A new high activity plasma cholinesterase variant. *J Med Genet.* 1988; 25(10): 677–681.
9. *McGuire M. C. et al.* Identification of the structural mutation responsible for the dibucaine-resistant (atypical) variant form of human serum cholinesterase. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1989; 86: 953–957.
10. *Nogueira C. P. et al.* Identification of two different point mutations associated with the fluoride-resistant phenotype for human butyrylcholinesterase. *Am. J. Hum. Genet.* 1992; 51: 821–828.
11. *Mironov A.N.* Guidelines for pre-clinical trials of drugs. Part 1. Moscow, 2012 (in Russian).
12. *Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V. Jr., Featherstone R.M.* A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 1961; 7: 88–95.
13. *TaqMan® OpenArray® Genotyping. Getting Started Guide (2010).* Available at: [http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cms\\_058198.pdf](http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cms_058198.pdf) (accessed 1 May 2014).

*A.V. Babkin<sup>1</sup>, I.S. Berdinskih<sup>1</sup>, N.S. Osechkina<sup>1</sup>, G.V. Nazarov<sup>1</sup>, M.A. Judin<sup>1</sup>, V.N. Bykov<sup>1</sup>, A.M. Sarana<sup>2</sup>*

### ASSOCIATION OF *Bche* GENE POLYMORPHIC VARIANTS WITH BUTYRYLCHOLINESTERASE ACTIVITY IN RATS POISONED WITH MALATHION

<sup>1</sup>Scientific Research Test Institute of Military Medicine, S.M. Kirov Medical Military Academy, 195043, Saint-Petersburg, Russian Federation

<sup>2</sup>City Hospital № 40, 197706 Sestrotretsk, Saint-Petersburg, Russian Federation

The association of *Bche* gene polymorphisms with butyrylcholinesterase activity was investigated on a model of rats poisoned with malathion at a dose of 1 LD<sub>50</sub>. The genotype distribution of six polymorphic variants of *Bche* gene was studied. An authentic association ( $p < 0.05$ ) of variants T>C (SNPID rs198598583), G>T (SNPID rs106118718), A>T (SNPID rs107226860) with butyrylcholinesterase activity in the liver tissue a day after poisoning was shown; the prevalence of those polymorphic variants is associated with linked type of inheritance. The highest linkage correlation of the enzyme activity in the liver was observed in variants A>T (rs107226860) and G>T (rs106118718). Enzyme activity in rats with a homozygous genotype was authentically higher ( by 30 %) compared to the heterozygous genotype.

**Key words:** *gene polymorphism, Bche gene, butyrylcholinesterase activity, intoxication, malathion*

Материал поступил в редакцию 9.07.2014 г.

УДК 613.632:092.2

# ОЦЕНКА ТОКСИЧНОСТИ 3-БРОМАМИНОБЕНЗОЛА СУЛЬФАТА КАК ОСНОВА ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО РИСКА ЗДОРОВЬЮ

Н.А. Мартынова,

Л.Г. Горохова

ФГБУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем гигиены и профессиональных заболеваний» СО РАМН, 654041, Кемеровская обл., г. Новокузнецк, Российская Федерация

**И**зучены токсические свойства 3-бромаминобензола сульфата с целью его гигиенического нормирования в воздухе рабочей зоны.  $DL_{50}$  вещества при введении в желудок для крыс-самок и мышей-самцов и самок составляет соответственно 1120, 2000 и 2973 мг/кг (3 класс опасности по ГОСТ 12.1.007-76). Существенных различий в видовой и половой чувствительности животных к веществу не выявлено: коэффициент видовых различий – 2,7; коэффициент половой чувствительности – 1,5. Не оказывает местного раздражающего действия на кожу, обладает умеренным раздражающим действием на слизистые оболочки глаз. Сенсибилизирующего действия не выявлено. Обладает слабой способностью к кумуляции:  $C_{cum} > 5$ .

В подостром эксперименте отмечено избирательное поражение красной крови (метгемоглобинемия, сульфгемоглобинемия) с развитием гемолитической анемии регенераторного характера, а также нарушение функции печени и почек. Порог острого ингаляционного действия – 22,2 мг/м<sup>3</sup>.

Ориентировочный безопасный уровень воздействия в воздухе рабочей зоны – 1 мг/м<sup>3</sup>.

**Ключевые слова:** 3-бромаминобензола сульфат, токсикологическая характеристика, гигиеническое нормирование.

**Введение.** Химико-фармацевтическое производство имеет ряд таких особенностей, как использование большого количества разнообразных видов химического сырья, многообразие промежуточных продуктов синтеза лекарственных средств, прерывистый и много-стадийный характер технологических процессов, несовершенство в ряде случаев технологических схем действующих производств, что может привести к значительным выбросам вредных веществ в воздух рабочей зоны и атмосферу [1]. Профилактической основой безопасности вредных веществ является их гигиеническое регламентирование (установление ПДК, ОБУВ). Соблюдение гигиенических нормативов гарантирует сохранение здоровья работающих. Однако не всегда представляется возможным оценить последствия возможного превышения нормативов и разработать оптимальную тактику профилактики и социальной защиты работающих в неблагоприятных условиях труда. Для совершенствования мер профилактики профзаболеваний необходима оценка реальных экспозиций вредных факторов и потенциального медико-социального ущерба для адекватной оценки и прогнозирования профессионального риска здоровью [2]. Оценке профессионального риска для здоровья работников промышленных предприятий и принятию на его основе ответственных управленческих решений, направленных на оптимизацию условий труда и здоровья работающих, посвящены работы многих авторов [3, 4, 5].

Нами изучены токсические свойства 3-бромаминобензола сульфата БАБС с целью его гигиенического нормирования в воздухе рабочей зоны.

БАБС является полупродуктом производства лекарственного препарата Трамадол и относится к группе ароматических аминов, наиболее характерным проявлением токсическо-

го действия которых является избирательное поражение красной крови. Ключевой механизм этого процесса – окисление гемоглобина (Hb) с переходом железа из двухвалентного в трехвалентное состояние и образование метгемоглобина (MtHb), в результате чего Hb утрачивает способность переносить кислород к органам и тканям. Как следствие развивается гемическая гипоксия, видимые признаки которой – цианоз и темный цвет крови. Тяжесть острого отравления определяется степенью метгемоглобинемии. Наряду с MtHb при интоксикации ароматическими аминами в крови появляется сульфгемоглобин (SfHb), наличие которого в крови резко усиливает цианоз. Специфическим симптомом поражения красной крови служит и появление в ней телец Гейнца, которые, образуясь внутриэритроцитарно, способны разрушать мембрану и располагаться внеклеточно. Массовое разрушение эритроцитов приводит к падению их числа, следствием чего является развитие гемолитической анемии. Наряду с избирательным поражением красной крови для аминов ряда бензола характерны расстройства функции ЦНС, печени, почек и сдвиги активности окислительно-восстановительных ферментов [6, 7].

**Материалы и методы исследования.** БАБС представляет собой кристаллический порошок белого цвета с желтоватым оттенком со слабым запахом. В воде мало растворим (0,1г/25мл).

Брутто формула:  $C_8H_8BrN \cdot 0,5H_2SO_4$ .

Молекулярная масса 221,06.

Экспериментальные исследования проведены на нелинейных белых мышах и крысах, морских свинках и кроликах. Содержание, питание, уход за животными и выведение их

**Мартынова Нина Андреевна (Martynova Nina Andreevna)**, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории прикладных гигиенических исследований ФГБУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем гигиены и профессиональных заболеваний» Сибирского отделения РАМН, 654041, г. Новокузнецк, ecologia\_nie@mail.ru  
**Горохова Лариса Геннадьевна (Gorokhova Larisa Gennadjevna)**, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории экспериментальных гигиенических исследований ФГБУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем гигиены и профессиональных заболеваний» Сибирского отделения РАМН, 654041, г. Новокузнецк, ropomartikova@mail.ru

из эксперимента проводили в соответствии с требованиями «Правил лабораторной практики» (приказ Минздравсоцразвития России от 23.08.2010 г. № 708н). Токсические свойства БАБС изучали в однократных и повторных экспериментах при введении вещества в желудок, ингаляционном воздействии, нанесении на неповрежденную кожу и слизистые оболочки глаз в соответствии с «Методическими указаниями к постановке исследований для обоснования санитарных стандартов вредных веществ в воздухе рабочей зоны» (№ 2163-80). Критериями токсичности служили общее состояние и поведение животных, их гибель, динамика ряда физиологических, биохимических, гематологических и патоморфологических показателей. Определение концентрации БАБС в воздухе затравочных камер проводили фотометрическим методом. Полученные данные обрабатывали методом вариационного анализа (t-критерий Стьюдента-Фишера).

**Результаты и обсуждение.** Величина средней смертельной дозы ( $DL_{50}$ ) БАБС при введении в желудок в виде масляной эмульсии для крыс-самок и мышей-самцов и самок составила соответственно 1120 (874,2±1434,8), 2000 (1251,8±3194,8) и 2973 (2374,4±3722,4) мг/кг (метод Литчфилда и Уилкоксона), что позволяет, согласно требованиям ГОСТ 12.1.007-76, отнести БАБС к веществам 3 класса опасности. Существенных различий в видовой и половой чувствительности животных к веществу не выявлено: коэффициент видовой чувствительности (КВЧ) и коэффициент половой чувствительности (КПЧ) равны соответственно 2,7 и 1,5.

Клиническая картина острого отравления животных характеризовалась цианозом кожных покровов и слизистых оболочек, малоподвижностью, нарушением координации движения, миорелаксацией, урежением дыхания, снижением температуры тела и гибелью, преимущественно в течение первых трех суток после введения вещества.

БАБС оказывает умеренное раздражающее действие на слизистые оболочки глаз: введение в конъюнктивальный мешок глаза кроликов 50 мг вещества сопровождалось гиперемией, слезотечением, инъекцией сосудов склеры, выраженным отеком век с частичным выворачиванием нижнего века. Явления раздражения проходили на 5 сутки. БАБС не обладает местным раздражающим действием на кожу: двадцатикратные 4-часовые аппликации 30%-ной мази вещества на кожу морских свинок не оказывали раздражающего действия. Аппликации БАБС на хвосты крыс также не оказывали раздражающего действия, но сопровождалась увеличением у опытных животных в процессе затравки суммационно-порогового показателя (СПП), активности АсАТ сыворотки крови и уменьшением числа эритроцитов, что свидетельствует о наличии у БАБС умеренного кожно-резорбтивного эффекта.

При изучении сенсибилизирующего действия в опытах на морских свинках методом многократных эпикутанных аппликаций аллергенных свойств у БАБС не выявлено. БАБС обладает слабой способностью к кумуляции: коэффициент кумуляции ( $C_{cum}$ ) – более 5 (метод Lim et al., 1961).

У опытных животных после введения БАБС в суммарной дозе, равной 5,99  $DL_{50}$ , отмечено отставание в приросте массы тела и снижение температуры тела по сравнению с контролем. При исследовании периферической крови выявлено резкое снижение числа эритроцитов и содержания гемоглобина. Содержание оксигемоглобина снижено за счет образования метгемоглобина и сульфгемоглобина. Наряду с этим отмечался высокий ретикулоцитоз и лейкоцитоз (табл. 1). При биохимическом исследовании сыворотки крови выявлены резкое снижение каталазного числа эритроцитов и нарушение функции печени, о чем свидетельствуют повышение активности АсАТ, увеличение содержания билирубина и снижение холестерина крови, а также диспротеинемия, которая выражалась в уменьшении содержания альбуминов и увеличении  $\beta$ - и  $\gamma$ -глобулиновых фракций. При исследовании мочи отмечено увеличение ее относительной плотности и уменьшение содержания хлоридов (табл. 2).

У животных, умерщвленных после окончания затравки, кровь и внутренние органы коричневого цвета. Коэффициенты массы селезенки опытных животных (14,8±0,96) увеличены по сравнению с контролем (4,3±0,27,  $P<0,001$ ). При морфологическом исследовании в красной пульпе селезенки внутри- и внеклеточно – наличие большого количества железо-содержащего пигмента (окраска по Перлсу). Кроме того, выявлена значительная жировая дистрофия почек и умеренно выраженная жировая дистрофия печени. Содержание гликогена в цитоплазме гепатоцитов уменьшено (окраска по Шабдашу), в клетках Купфера – наличие железо-содержащего пигмента.

Таким образом, наиболее характерным проявлением токсического действия БАБС является избирательное поражение красной крови (метгемоглобинемия, сульфгемоглобинемия), следствием чего является развитие гемолитической анемии регенераторного характера, характе-

ризующейся высоким уровнем ретикулоцитоза. Наряду с избирательным поражением красной крови выявлены и нарушения функции печени и почек, обусловленные, по-видимому, гипоксией и гипоксемией за счет метгемоглобинемии.

Для определения порога острого действия ( $Lim_{oc}$ ) в условиях динамического ингаляционного воздействия в опытах на крысах были испытаны концентрации, равные 162, 22,2 и 9,2 мг/м<sup>3</sup>. Для оценки состояния животных были использованы показатели, оказавшиеся наиболее чувствительными при проведении подострого эксперимента.

Из таблицы 3 видно, что БАБС в концентрации 162 мг/м<sup>3</sup> вызывал статистически значимое понижение температуры тела, СПП и активности АсАТ. При исследовании красной крови отмечено наличие в ней дериватов гемоглобина – метгемоглобина и сульфгемоглобина, что позволяет считать эту концентрацию действующей. Концентрация 9,2 мг/м<sup>3</sup> является недействующей, так как не вызвала достоверных изменений избранных показателей. В качестве пороговой нами принята концентрация БАБС 22,2 мг/м<sup>3</sup>, при которой отмечено снижение температуры тела, повышение СПП и достоверное увеличение метгемоглобина крови.

**Заключение.** Величина ориентировочного безопасного уровня воздействия (ОБУВ) БАБС, рассчитанная по уравнениям (№9, 10, 11, 61, 62), рекомендованным «Методическими указаниями по установлению ориентировочных безопасных уровней воздействия вредных веществ в воздухе рабочей зоны» (№ 4000-85) с учетом  $DL_{50}$ ,  $Lim_{oc}$ ,  $C_{cum}$ , равна 0,99 мг/м<sup>3</sup>. При обосновании ОБУВ БАБС учитывался опыт гигиенического нормирования и таких ароматических аминов, как аминофенол (ПДК 1 мг/м<sup>3</sup>) и 3-бромаминобензола гидрохлорид (ОБУВ 0,5 мг/м<sup>3</sup>).

Учитывая изложенное, рекомендован и утвержден ОБУВ 3-бромаминобензола сульфата в воздухе рабочей зоны 1 мг/м<sup>3</sup>, агрегатное состояние – аэрозоль (ГН 2.2.5.2308-07).

Таблица 1

## Показатели крови крыс при подостром отравлении БАБС

Показатели	Группа животных (n=8)	После введения 5,99 DL <sub>50</sub>
Гемоглобин, г/л	Опыт	72,8±4,40**
	Контроль	134,1±1,46
Оксигемоглобин, %	Опыт	92,8±0,89**
	Контроль	99,0±0,18
Метгемоглобин, %	Опыт	3,52±0,73*
	Контроль	0,98±0,18
Сульфгемоглобин, %	Опыт	3,50±0,31**
	Контроль	Отсутствует
Ретикулациты, %	Опыт	387,5±48,0
	Контроль	28,4±2,48
Эритроциты, 10 <sup>12</sup> /л	Опыт	2,43±0,15**
	Контроль	6,84±9,10
Лейкоциты, 10 <sup>9</sup> /л	Опыт	23,3±1,69**
	Контроль	10,3±1,39

Примечание: \* при P<0,05; \*\* при P<0,001 – достоверное различие по сравнению с контрольной группой животных.

Таблица 2

**Показатели функционального состояния крыс при подостром отравлении БАБС**

Показатели		Группа животных (n=8)	После введения 5,99 DL <sub>50</sub>
Исследование сыворотки крови			
Активность АсАТ, ммоль/(ч·л)		Опыт Контроль	1,52±0,059* 1,29±0,046
Активность АлАТ, ммоль/(ч·л)		Опыт Контроль	0,60±0,032 0,67±0,052
Каталаза эритроцитов крови, мг/мкл		Опыт Контроль	5,58±0,42*** 11,50±0,40
Билирубин, отн.ед.		Опыт Контроль	13,50±1,63** 6,05±1,09
Белковые фракции	Альбумины, %	Опыт Контроль	53,3±1,20* 58,4±1,47
	β-Глобулины, %	Опыт Контроль	19,8±0,53** 15,1±0,67
	γ-Глобулины, %	Опыт Контроль	15,0±0,56* 12,8±0,58
Холестерин, ммоль/л		Опыт Контроль	1,74±0,16** 2,47±0,11
Исследование мочи			
Относительная плотность мочи, кг/л		Опыт Контроль	1,0339±0,0045* 1,0223±0,0018
Содержание ионов хлора, ммоль		Опыт Контроль	0,107±0,016* 0,202±0,038

Примечание: \* при P<0,05; \*\* при P<0,01; \*\*\* при P<0,001 – достоверное различие по сравнению с контрольной группой животных.

Таблица 3

**Показатели функционального состояния крыс после однократной ингаляционной заправки пылью БАБС**

Показатели	Группа животных (n=10)	Концентрация, мг/м³		
		162,0±42,3	22,2±5,39	9,2±1,09
СПП, В	Опыт Контроль	6,5±0,31* 7,8±0,41	6,8±0,41* 5,9±0,31	6,6±0,41 6,8±0,41
Температура тела, °С	Опыт Контроль	35,0±1,270* 38,2±0,082	37,7±0,240* 38,3±0,062	37,9±0,124 37,8±0,124
Активность АсАТ, ммоль/(ч·л)	Опыт Контроль	0,93±0,088* 1,19±0,031	1,61±0,063 1,42±0,126	0,99±0,079 1,23±0,099
Гемоглобин, г/л	Опыт Контроль	116,4±1,50 118,9±1,57	117,4±2,53 122,3±1,11	122,6±2,16 121,5±2,52
Метгемоглобин, %	Опыт Контроль	3,20±1,17* 0,76±0,03	1,01±0,31* 0,24±0,09	0,66±0,125 0,51±0,090
Сульфгемоглобин, %	Опыт Контроль	0,92±0,25** Отсутствует	Отсутствует Отсутствует	Отсутствует Отсутствует

Примечание: \* при P<0,05; \*\* при P<0,01 – достоверное различие по сравнению с контрольной группой животных.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Буров Ю.В., Рожнов Г.И. Актуальные эколого-гигиенические проблемы в химико-фармацевтической и биотехнологической промышленности. Гигиена и санитария. 1995; 4: 21–25.
2. Измеров Н.Ф., Денисов Э.И., Молодкина Н.Н. Основы управления риском ущерба здоровью в медицине труда. Медицина труда и промышленная экология. 1998; 3: 1–8.
3. Захаренков В.В., Олещенко А.М., Данилов И.П., Суржиков Д.В., Кислицына В.В., Корсакова Т.Г. Оценка профессионального риска для здоровья работников промышленных предприятий на основе медицинской технологии. Академический журнал Западной Сибири. 2013; 9 (2): 8.
4. Кислицына В.В., Корсакова Т.Г., Мотуз И.Ю. Особенности условий труда и профессионального риска работников, занятых при открытой добыче угля. Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2013; 4: 52–55.
5. Горыхова Л.Г., Суржиков Д.В., Михайлова Н.Н., Мартынова Н.А. Оценка риска неблагоприятного воздействия на здоровье работников промышленного синтеза препаратов бензодиазепинового ряда. Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра СО РАМН. 2013; ч. 2; 3 (91): 57–59.
6. Курляндский В.А., ред. Вредные химические вещества. Азотосодержащие органические соединения. Л.: Химия; 1993.
7. Лещёва Л.А., Мартынова Н.А., Баева В.Н., Бессонова Н.И., Горыхова Л.Г., Михеева Н.Н. Сульфат м-броманилина (новые сведения о токсичности и опасности). Токсикологический вестник. 1997; 3: 36–37.

## REFERENCES:

1. Burov Yu.V., Rozhnov G.I. Actual ecological and hygienic problems in the chemical, pharmaceutical and biotechnology industries. Gigena i sanitariya. 1995; 4: 21–25 (in Russian).
2. Izmerov N.F., Denisov E.I., Molodkina N.N. Fundamentals of risk management of damage to health in occupational medicine. Meditsina truda i promyshlennaya ekologiya. 1998; 3: 1–8 (in Russian).
3. Zakharikov V.V., Oleshchenko A.M., Danilov I.P., Surzhikov D.V., Kislytsyna V.V., Korsakova T.G. Evaluation of occupational risk to health of the workers of industrial enterprises on the basis of medical technology. Akademicheskij zhurnal Zapadnoy Sibiri. 2013; 9 (2): 8 (in Russian).
4. Kislytsyna V.V., Korsakova T.G., Motuz I.Y. The features of the working conditions and occupational risk for the workers engaged in open coal mining. Mezhdunarodnyy zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy. 2013; 4: 52–55 (in Russian).
5. Gorokhova L.G., Surzhikov D.V., Mikhailova N.N., Martinova N.A. Risk assessment of the adverse impact of industrial synthesis of benzodiazepine drugs on human health. Byulleten' Vostochno-Sibirskogo nauchnogo tsentra SO RAMN. 2013; ch. 2, 3 (91): 57–59 (in Russian).
6. Kurlyandskiy V.A., ed. Harmful chemical substances. Nitrogen-containing organic compounds. L.: Khimiya; 1993 (in Russian).
7. Leshcheva L.A., Martynova N.A., Baeva V.N., Bessonova N.I., Gorokhova L.G., Mikhееva N.N. M-bromo-aniline sulfate (new information on the toxicity and hazards). Toksikologicheskij vestnik. 1997; 3: 36–37 (in Russian).

N.A. Martynova, L.G. Gorokhova

## EVALUATION OF TOXICITY OF 3-BROMO AMINOBENZENE SULFATE AS A BASIS FOR PREDICTION OF OCCUPATIONAL RISK TO HEALTH

Federal State Budgetary Institution «Research Institute for Complex Problems of Hygiene and Occupational Diseases», Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, 654041 Novokuznetsk, Russian Federation

Toxic properties of 3-bromo aminobenzene sulfate were studied for its hygiene regulation in workplace air. LD 50 of the substance administrated abdominally to female rats and male and female mice are respectively 1120, 2000 and 2973 mg/kg (III hazard class according to GOST 12.1.007-76). Significant differences in species and sex sensitivity of animals to the substance are not found: the coefficient of species differences is 2.7; coefficient of sex sensitivity is 1.5. It poses no local irritation to the skin and has a moderate irritant effect on the eye mucous membranes. Sensitizing effect is not revealed. It has a weak ability to cumulation: Ccum > 5.

In a sub-acute experiment selective lesion of red blood cells (methemoglobinemia, sulfhemoglobinemia) with the development of hemolytic anemia of regenerative nature was observed, as well as damage to the liver and kidneys. The threshold of acute inhalation action is 22.2 mg/m<sup>3</sup>.

The tentative safe exposure level in the workplace air is 1 mg/m<sup>3</sup>.

**Key words:** 3-bromo aminobenzene sulfate, toxicological characteristics, hygiene regulation.

Материал поступил в редакцию 27.05.2014 г.

УДК 613 : 615.9

# МЕТИЛМЕРКАПТАН (СИНОНИМЫ: МЕТАНТИОЛ, ТИОМЕТИЛАЛКОГОЛЬ, МЕРКАПТОМЕТАН, ТИОМЕТАНОЛ)

М.А. Пинигин, О.В. Бударина,  
Л.А. Федотова, А.А. Сафуллин,  
А.В. Цуканов

ФГБУ НИИ экологии человека и гигиены окружающей среды им. А.Н. Сысина Минздрава  
России, 119121, г. Москва, Российская Федерация

**В** настоящей работе представлено обоснование гармонизации максимальной разовой ПДК (ПДК<sub>м.р.</sub>) метилмеркаптана в атмосферном воздухе со значениями его стандартов, принятых в Швеции и Финляндии (0,006 мг/м<sup>3</sup>) для воздуха в районах размещения целлюлозно-бумажных комбинатов. На основании проведенных исследований установлено, что гармонизируемая ПДК<sub>м.р.</sub> метилмеркаптана (0,006 мг/м<sup>3</sup>) надежно обеспечивает как предупреждение развития резорбтивных эффектов, так и защиту населения от «навязчивого» запаха. Норматив утвержден Главным государственным санитарным врачом РФ (ГН 2.1.6.2326-08 – дополнение 4 к ГН 2.1.6.1338-03).

**Ключевые слова:** метилмеркаптан, максимальная разовая предельно допустимая концентрация, референтная концентрация, резорбтивное действие, рефлекторное действие.

Метилмеркаптан /ММК/ (CH<sub>3</sub>SH; № CAS: 74-93-1) относится к химическому классу тио-спиртов – органических соединений содержащих сульфгидрильную (меркапто) группу, связанную с углеводородным радикалом. Физико-химические свойства: молекулярная масса – 48,1; t кип. при 760 мм рт. ст. – 6,2°C; упругость пара в мм рт. ст. – >760; плотность – 0,8665 (20°/4°C); растворимость в воде при 20°C – 23,3 г/л. Агрегатное состояние вещества в атмосферном воздухе при 20° и 35°C – газ.

По параметрам токсичности (CL<sub>50</sub> для мышей 1700 и крыс – 1200-1320 мг/м<sup>3</sup>) ММК относится ко 2-му классу опасности. В хронических опытах на животных пороговая концентрация составила: в случае прерывистого действия – 10–15 мг/м<sup>3</sup> [14] и в случае непрерывного круглосуточного – 0,1 мг/м<sup>3</sup> [13].

Высокие концентрации ММК обладают сильным отвратительным запахом, оказывая рефлекторное действие на ряд вегетативных центров, что сопровождается появлением тошноты, рвоты, головных болей, ухудшением самочувствия и снижением трудоспособности у людей. Порог острого действия ММК по снижению умственной работоспособности человека равен 1–2 мг/м<sup>3</sup>. Неблагоприятное действие запаха на состояние и работоспособность человека является ведущим критерием вредности ММК [12, 14, 15]. Способен поражать органы дыхания и центральную нервную систему.

В Российской Федерации ПДК ММК в воздухе рабочей зоны установлена на уровне 0,8 мг/м<sup>3</sup>, что практически совпадает с аналогичным стандартом в ряде стран (США, Англия, Германия, Франция, Финляндия, Швейцария) – 1,0 мг/м<sup>3</sup>.

В настоящей работе представлено обоснование гармонизации максимальной разовой (20–30-минутной) ПДК (ПДК<sub>м.р.</sub>) метилмеркаптана в атмосферном воздухе со значениями его

стандартов, принятых в Швеции и Финляндии (0,006 мг/м<sup>3</sup>) для воздуха в районах размещения целлюлозно-бумажных комбинатов (ЦБК).

В основе установления действующей до 2008 г. ПДК<sub>м.р.</sub> метилмеркаптана (0,001 мг/м<sup>3</sup>) [3] лежало значение его референтной концентрации для хронического действия (0,001 мг/м<sup>3</sup>), то есть концентрации, которая, согласно [10], при непрерывном воздействии в течение 30 лет не вызывает нарушений со стороны критических органов – органов дыхания и центральной нервной системы человека.

Исходя из того, что концентрация метилмеркаптана в 0,001 мг/м<sup>3</sup> при длительном воздействии безопасна в отношении влияния на здоровье, следовало установить, что его концентрация в 0,006 мг/м<sup>3</sup> также будет безопасной при кратковременном 20-30-минутном воздействии. К сожалению, в «Руководстве по оценке риска...» (2004) отсутствует информация о референтной концентрации для острых ингаляционных воздействий метилмеркаптана, хотя из общих положений можно утверждать, что такая концентрация (0,006 мг/м<sup>3</sup>) не вызовет нарушений со стороны критических органов.

Для подтверждения были использованы данные, характеризующие острое и хроническое воздействие этилмеркаптана, который, согласно [10], является аналогом метилмеркаптана, так как его референтная концентрация для хронического воздействия совпадает с таковой метилмеркаптана (0,001 мг/м<sup>3</sup>). При этом у этилмеркаптана имеется референтная концентрация для острого воздействия, равная 0,1 мг/м<sup>3</sup> и превышающая концентрацию 0,006 мг/м<sup>3</sup> в 16,7 раз. Следовательно, концентрация этилмеркаптана в 0,006 мг/м<sup>3</sup> при кратковременном воздействии будет тем более безопасной для здоровья человека. Это положение можно целиком перенести и на метилмеркаптан, аналог этилмеркаптана, утверждая, что концентрация этого вещества в ат-

**Пинигин Мигмар Александрович (Pinigin Migmara Aleksandrovich)** – д.м.н., профессор, академик РАЕН, заведующий лабораторией гигиены атмосферного воздуха; ФГБУ НИИ экологии человека и гигиены окружающей среды им. А.Н. Сысина Минздрава России, 119121, г. Москва.  
**Бударина Ольга Викторовна (Budarina Olga Viktorovna)** – к.м.н., в.н.с. лаборатории гигиены атмосферного воздуха; ФГБУ НИИ экологии человека и гигиены окружающей среды им. А.Н. Сысина Минздрава России, 119121, г. Москва. vozduch2002@mail.ru  
**Федотова Лионелла Айдыновна (Fedorova Lionella Aidynovna.)** – к.м.н., с.н.с. лаборатории гигиены атмосферного воздуха; ФГБУ НИИ экологии человека и гигиены окружающей среды им. А.Н. Сысина Минздрава России, 119121, г. Москва. fedotov2003@mail.ru  
**Сафуллин Анвар Ахатович (Safullin Anvar Ahatovich.)** – к.м.н., с.н.с. лаборатории гигиены атмосферного воздуха; ФГБУ НИИ экологии человека и гигиены окружающей среды им. А.Н. Сысина Минздрава России, 119121, г. Москва.  
**Цуканов Андрей Владимирович (Tsukanov Andrey Viktorovich)** – н.с. лаборатории гигиены атмосферного воздуха; ФГБУ НИИ экологии человека и гигиены окружающей среды им. А.Н. Сысина Минздрава России, 119121, г. Москва.

мосферном воздухе 0,006 мг/м<sup>3</sup> при кратковременном воздействии будет безопасна в отношении критических органов и влияния на здоровье.

Таким образом, есть полное основание утверждать, что рекомендуемая величина гармонизируемой 20-30-минутной ПДК<sub>кр</sub> метилмеркаптана в атмосферном воздухе (0,006 мг/м<sup>3</sup>), являясь безопасной в отношении резорбтивного действия при кратковременном воздействии, не будет оказывать вредного влияния на здоровье человека, в том числе, на критические для этого вещества органы – органы дыхания и центральную нервную систему человека. И действительно, данные эпидемиологических исследований [6, 9] не позволили установить вредного влияния загрязнения атмосферного воздуха метилмеркаптаном на уровне 0,006 мг/м<sup>3</sup> на состояние здоровья населения.

Однако гармонизируемая ПДК<sub>кр</sub> должна быть оценена не только с точки зрения ее безопасности, но и с точки зрения запаха этого вещества. Как известно, действующая до 2008 г. ПДК<sub>кр</sub> метилмеркаптана (0,001 мг/м<sup>3</sup>) была установлена с учетом запаха, причем вероятность его обнаружения на этом уровне составляет 30% [8].

Между тем, вероятность ощущения запаха на уровне 0,006 мг/м<sup>3</sup> составляет 79%, и остается неизвестным, является ли такая вероятность гигиенически допустимой, хотя В.А.Рязанов еще в 50-х годах прошлого столетия придавал большое значение такой характеристике запаха, как его «навязчивость» [11]. Однако в нашей стране эта идея Рязанова не получила должного развития, в то время как за рубежом широко используется такое понятие, как «запах, вызывающий раздражение у населения», при этом для оценки запаха могут использоваться различные критерии [15, 16, 17].

С целью оценки значимости вероятности ощущения запаха в 79% были проведены ольфактометрические и одориметрические исследования согласно [5] с помощью современной ольфактометрической аппаратуры (динамического ольфактометра «ЕСОМА ТО 8»), которые позволили установить взаимосвязь между параметрами кривых, отражающих вероятность ощущения запаха разной силы в зависимости от концентрации.

В результате проведенных исследований установлено, что вероятность ощущения «неопределенного» запаха в 79%, соответствующая концентрации метилмеркаптана на уровне 0,006 мг/м<sup>3</sup>:

1) соответствует 2,7 ЕЗ/м<sup>3</sup> (единиц запаха в м<sup>3</sup>), что значительно ниже уровня запаха, считающегося за рубежом критическим в отношении возникновения значительного «раздражения» населения (5 ЕЗ/м<sup>3</sup>), а также величин, рекомендуемых в Нидерландах и других европейских странах для новых и уже существующих свиноферм (3 и 6 ЕЗ/м<sup>3</sup> соответственно) [15];

2) соответствует вероятности ощущения запаха силой 2 балла («определенного») – 14%, силой 3 балла («раздражающего») – менее 1% (около 0,7%), что также не превышает нормативных значений, установленных за рубежом для запаха подобной силы [15, 17].

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют, что гармонизируемую ПДК<sub>кр</sub> метилмеркаптана (0,006 мг/м<sup>3</sup>) с учетом ее запаха, определяемого с вероятностью 79%, с полным основанием можно признать допустимой, так как она находится на уровне значительно ниже, чем рекомендуемые в зарубежных странах по способности вызывать «раздражение» величины запаха.

Концентрация метилмеркаптана в атмосферном воздухе на уровне 0,006 мг/м<sup>3</sup> может быть рекомендована в качестве ПДК<sub>кр</sub> как 98-й перцентиль и может быть превышена в 2% случаев [1], что соответствует и рекомендациям, принятым за рубежом [15, 17].

В связи с вышеизложенным, можно сделать следующие **выводы**:

1. Гармонизируемая ПДК<sub>кр</sub> метилмеркаптана (0,006 мг/м<sup>3</sup>), являясь 98-м перцентилем, надежно обеспечивает предупреждение развития резорбтивных эффектов, в частности при воздействии метилмеркаптана на критические для него органы – органы дыхания и ЦНС человека;
2. Эта концентрация, оставаясь ниже уровней, вызывающих, согласно [15], значительное раздражение, обеспечивает защиту населения от «навязчивого» запаха.
3. На основании проведенных исследований величина в 0,006 мг/м<sup>3</sup> была рекомендована в качестве максимальной разовой ПДК для метилмеркаптана (метантиола) (класс опасности – 4, лимитирующий показатель вредности – рефлекторное действие). Норматив утвержден Главным государственным санитарным врачом РФ (ГН 2.1.6.2326-08 – дополнение 4 к ГН 2.1.6.1338-03).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Временные методические указания по обоснованию предельно допустимых концентраций (ПДК) загрязняющих веществ в атмосферном воздухе населенных мест, №4681-88, МЗ СССР, М.; 1989.
2. ГН 2.1.6.1338-03 «Предельно допустимые концентрации (ПДК) загрязняющих веществ в атмосферном воздухе населенных мест». - МЗ РФ. - М., 2003.
3. ГН 2.1.6.1983-05 «Предельно-допустимые концентрации (ПДК) загрязняющих веществ в атмосферном воздухе населенных мест». Дополнение №2 к ГН 2.1.6.1338-03. - МЗ РФ. - М.; 2005.
4. ГН 2.1.6.2326-08 «Предельно-допустимые концентрации (ПДК) загрязняющих веществ в атмосферном воздухе населенных мест». Дополнение №4 к ГН 2.1.6.1338-03. - МЗ РФ. - М.; 2008.
5. Европейский стандарт «CEN (2003). Air quality – Determination of odour concentration by dynamic olfactometry. EN 13725:2003», European committee for standardisation.
6. Ефимова Н.В. и соавт. Влияние аэрозольных выбросов предприятий целлюлозно-бумажной промышленности на заболеваемость населения. Гигиена и санитария. 1992; 3: 65-6.
7. Лазарев Н.В. Вредные вещества в промышленности. Л.: Госхимиздат. 1963; ч.1.
8. Материалы по гигиеническому обоснованию максимальной разовой предельно-допустимой

- концентрации метилмерcaptана в атмосферном воздухе. М., ГУ НИИ ЭЧиГОС им. А.Н.Сысина РАМН; 2005.
9. Обоснование корректировки санитарно-защитной зоны Котласского ЦБК в г.Коряжма Архангельской области. М., ГУ НИИ ЭЧиГОС им. А.Н.Сысина РАМН; 2007.
10. Руководство по оценке риска для здоровья населения при воздействии химических веществ, загрязняющих окружающую среду. Р 2.1.10.1920-04. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. М.; 2004.
11. Рызанов В.А. Основные принципы гигиенического нормирования атмосферных загрязнений. Гигиена и санитария 1949; 5: 3 - 9.
12. Сельчухинский Г.В. Основные вопросы охраны внешней среды при производстве сульфатной целлюлозы. Дисс. Л.; 1972.
13. Тимофеев В.П. Санитарно-гигиеническая и токсикологическая характеристика метилмерcaptана и диметилсульфида. Автореф. дисс. Л.; 1968.
14. Шугаев Б.В. Токсичность и гигиеническое нормирование метилмерcaptана. В кн.: Под общ. ред. Г.Д.Гальперина и др. Органические соединения серы. 1976; т.1: 416-8.
15. Assessment of Community Response to Odorous Emissions. R&D Technical Report P4-095/TR.

Environment Agency, 2002.

16. Winneke G. The Assessment of the Impact of Environmental Odours in the Community. Environmental Odour Management, International Conference, Cologne, 17 – 19 November 2004; 5 – 7.
17. Determination and assessment of odour in ambient air (Guideline on odour in ambient air / GOAA), dated 13 May, 1998, with background information and interpretation to the GOAA issued 7 May, 1999.

## REFERENCES:

1. Temporary guidance on justification of maximum permissible concentration (MPC) of pollutants in the air of residential areas, № 4681-88, MZ SSSR, M.; - 1989. (in Russian)
2. GN 2.1.6.1338-03 "Maximum permissible concentration (MPC) of pollutants in the air of residential areas." – MZ RF. – M.; 2003. (in Russian)
3. GN 2.1.6.1983-05 "Maximum permissible concentration (MPC) of pollutants in the air of residential areas." Addition number 2 to the GN 2.1.6.1338-03. - MZ RF. – M.; 2005. (in Russian)
4. GN 2.1.6.2326-08 "Maximum permissible concentration (MPC) of pollutants in the air of residential areas." Addition number 4 to the GN 2.1.6.1338-03. - MZ RF. – M.; 2008. (in Russian)
5. European standard «CEN (2003). Air quality - Determination of odour concentration by dynamic olfactometry. EN 13725:2003». European committee for standardisation.
6. Efimova N.V. et al. Effect of emissions enterprises of pulp and paper industry on public health. Gigena i sanitariya. 1992. 3. 65-6. (in Russian)
7. Lazarev N.V. The harmful substances in industry. L.: Goskhimizdat. 1963; ch.1.
8. Materials Hygienic justification maximum single maximum permissible concentration of methyl

- mercaptan in the air. M., GU NII EChIGOS im. A.N.Sysina RAMN; 2005. (in Russian)
9. Justification of corrections sanitary protection zone Kotlas PPM Koryazhma in the Arkhangelsk region. M., GU NII EChIGOS im. A.N.Sysina RAMN; 2007. (in Russian)
10. Human health risk assessment from environmental chemicals. P 2.1.10.1920-04. Federal'naya sluzhba po nadzoru v sfere zashchity prav potrebitel'ey i blagopoluchiya cheloveka. M.; 2004. (in Russian)
11. Ryazanov V.A. Basic principles of hygienic regulation of air pollution. Gigena i sanitariya. 1949; 5: 3-9. (in Russian)
12. Selchukitsky G.V. The main issues of the external environment in the production of sulphate pulp. Diss. L.; 1972. (in Russian)
13. Timofeev V.P. Sanitary-hygienic and toxicological characteristics of methyl mercaptan and dimethyl sulfide. Avtoref. diss. L.; 1968. (in Russian)
14. Shugaev B.V. Toxicity and hygienic standards of methyl mercaptan. V kn.: Pod obshch. red. G.D.Gal'perina i dr. Organicheskie soedineniya seriy. 1976; t.1: 416-8. (in Russian)
15. Assessment of Community Response to Odorous Emissions. R&D Technical Report P4-095/TR. Environment Agency, 2002.

16. Winneke G. The Assessment of the Impact of Environmental Odours in the Community // Environmental Odour Management, International Conference, Cologne, 17 – 19 November 2004; 5 – 7.
17. Determination and assessment of odour in ambient air (Guideline on odour in ambient air / GOAA), dated 13th May, 1998, with background information and interpretation to the GOAA issued 7th May, 1999.

M.A. Pnigin, O.V. Budarina, L.A. Fedotova, A.A. Safulin, A.V. Tsukanov

### METHYL MERCAPTAN

A.N. Sysin Research Institute of Human Ecology and Environmental Health Ministry of Health, 119992, Moscow, Russian Federation

The present work presents the rationale harmonization of maximum permissible concentration (MPC) of methyl mercaptan in the air with its standard values adopted in Sweden and Finland (0.006 mg/m<sup>3</sup>) in the air of areas with pulp and paper production. Based on these studies, it was found that harmonized MPC of methyl mercaptan (0.006 mg/m<sup>3</sup>) reliably provides preventing of development of respiratory effects as well as protection of the population from "obsessive" odour. The normative was approved by the Chief State Sanitary Physician of the Russian Federation (GN 2.1.6.2326-08 - Attachment 4 to GN 2.1.6.1338-03).

**Keywords:** methyl mercaptan, maximum single limit permissible concentration, the reference concentration, respiratory effect, reflex action

Материал поступил в редакцию 20.09.2012 г.

УДК 615.2 : 615.92

# ТОКСИКОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА БИОАКТИВНЫХ КОМПОЗИЦИЙ НА ОСНОВЕ МОДИФИЦИРОВАННОЙ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ ВИТАМИНАМИ И АМИНОКИСЛОТАМИ

А.В. Карамышева<sup>1</sup>, Г.В. Сон<sup>1</sup>, Н.М. Перова<sup>1</sup>, М.В. Мнихович<sup>1</sup>, С.А. Успенский<sup>2</sup>, П.Л. Иванов<sup>2</sup>, В.Н. Хабаров<sup>2</sup>, М.А. Селянин<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «ВНИИИМТ» Росздравнадзор (Всероссийский научно-исследовательский и испытательный институт медицинской техники), 115478, г. Москва, Российская Федерация  
<sup>2</sup>АНО «Международный научно-исследовательский центр инновационных технологий МАРТИНЕКС», 111123, г. Москва, Российская Федерация

**П**роведены экспериментальные исследования биологического действия отечественного препарата ГИАЛРИПАЙЕР-02 на основе гиалуроновой кислоты или ее соли модифицированной аскорбиновой кислотой и аминокислотами на белых крысах. Установлено, что препарат не оказал неблагоприятного воздействия на организм животных: гематологические, биохимические и иные показатели, характеризующие состояние систем и органов у животных, подвергавшихся воздействию исследуемых соединений, не имели статистически значимых отличий от аналогичных показателей контроля. Высказано предположение о возможности его применения в косметологии, в травматологии для замещения суставной жидкости.

**Ключевые слова:** гиалуроновая кислота, аскорбиновая кислота, аминокислоты, Гиалрипайер, токсичность.

**Введение.** Современный этап развития реконструктивной медицины отмечается существенным техническим перевооружением с большой долей участия достижений химической науки, которое заключается не только в синтезе новых соединений, но и в усовершенствовании уже разработанных, нашедших широкое применение в различных областях медицины. В этом смысле гиалуроновая кислота представляет собой продукт, привлекающий внимание специалистов в качестве объекта, способного приобретать новые свойства при целенаправленной ее модификации [1].

В настоящее время препараты на основе гиалуроновой кислоты нашли прочное применение в косметологии для эстетической коррекции небольших дефектов лица (морщин, рубцов и т.д.), мезотерапии, биоревитализации, биорепарации, контурной пластики и в реконструктивной хирургии для замещения мягких тканей, в травматологии для замещения суставной жидкости, в стоматологии для лечения пародонтита и гингивита [2].

Чрезвычайно актуальной задачей является реализация адресной доставки биологически активных соединений к конкретным клеточным структурам организма для стимуляции их

метаболизма. Одним из способов решения таких задач стал выпуск препарата ГИАЛРИПАЙЕР-02, который включает в себя матрицу-носитель, в качестве модифицированной гиалуроновой кислоты и химически привитых к ней низкомолекулярных компонентов в виде аминокислот и витаминов [3].

Актуальность проблемы разработки и, соответственно, оценки биологической безопасности, новых гелевых лечебных материалов не вызывает сомнения, так как эти изделия имеют прямой контакт часто с пораженными тканями человека, обуславливая тем самым поступление лекарственных средств с возможным неблагоприятным воздействием на организм пациента в целом.

Целью исследования являлось получение информации о возможном нежелательном воздействии материалов на организм человека при практическом их применении.

Задачей исследования было изучение и оценка биологического действия вновь разработанных материалов в эксперименте, который бы наиболее близко отвечал условиям практического применения материалов, с целью экстраполяции результатов на организм человека.

**Карамышева Анна Валериевна (Karamysheva Anna Valeriyevna)**, старший научный сотрудник отдела токсикологических испытаний и исследований материалов и медицинских изделий ФГБУ «ВНИИИМТ» Росздравнадзора (Всероссийский научно-исследовательский и испытательный институт медицинской техники), 115478, г. Москва, vniimt34@mail.ru

**Сон Григорий Валентинович (Son Grigory Valentinovich)**, старший научный сотрудник отдела токсикологических испытаний и исследований материалов и медицинских изделий ФГБУ «ВНИИИМТ» Росздравнадзора (Всероссийский научно-исследовательский и испытательный институт медицинской техники), 115478, г. Москва, vniimt34@mail.ru

**Перова Нина Михайловна (Perova Nina Mikhailovna)**, кандидат медицинских наук, начальник отдела токсикологических испытаний и исследований материалов и медицинских изделий ФГБУ «ВНИИИМТ» Росздравнадзора (Всероссийский научно-исследовательский и испытательный институт медицинской техники), 115478, г. Москва, vniimt34@mail.ru

**Мнихович Максим Валерьевич (Mnikhovich Maxim Valerievich)**, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник отдела токсикологических испытаний и исследований материалов и медицинских изделий ФГБУ «ВНИИИМТ» Росздравнадзора (Всероссийский научно-исследовательский и испытательный институт медицинской техники), 115478, г. Москва, vniimt34@mail.ru, ведущий научный сотрудник Центральной патологоанатомической лаборатории ФГБУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека» РАМН (ФГБУ НИИМЧ РАМН), 117418, г. Москва, mnicmaxim@yandex.ru

**Успенский Сергей Алексеевич (Uspenskiy Sergey Alekseevich)**, кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник АНО «Международный научно-исследовательский центр инновационных технологий МАРТИНЕКС», 111123, г. Москва, s.a.uspenski@mail.ru

**Иванов Павел Леонидович (Ivanov Pavel Leonidovich)**, научный сотрудник АНО «Международный научно-исследовательский центр инновационных технологий МАРТИНЕКС», 111123, г. Москва, ivanovpl@inbox.ru

**Хабаров Владимир Николаевич (Khabarov Vladimir Nikolaevich)**, кандидат химических наук, генеральный директор АНО «Международный научно-исследовательский центр инновационных технологий МАРТИНЕКС», 111123, г. Москва, info@nc-martineks.ru

**Селянин Михаил Анатольевич (Selyanin Mikhail Anatolyevich)**, президент группы компаний «Мартинекс», 111123, г. Москва, alo@martineks.ru

**Материалы и методы исследования.** Материал представляет собой прозрачное бесцветное однородное студенистое вещество на основе водного раствора гиалуроновой кислоты и сополимера гиалуроновой кислоты с аскорбилфосфатом натрия или магния, полученного методом твердофазной модификации [4], в который введены функциональные добавки в виде аминокислот. Компоненты ГИАЛРИПАЙЕР-02 и их количества приведены в таблице 1.

Материал выпускается в стеклянных шприцах или флаконах. Все образцы стерилизованы паровым методом в соответствии с МУ 287-113 или ГОСТ Р ИСО 11134.

Испытания образцов проводили с применением санитарно-химических и токсикологических видов их оценки. Санитарно-химические испытания проводят с помощью интегральных и специфических методов – оценивается химическая стабильность материала, природа мигрирующих из изделий химических соединений и их потенциальная опасность; устанавливающие стерильность и апиrogenность материала. Оценка возможного токсического действия представленных на испытания материалов проводилась в соответствии с документами: ГОСТ Р ИСО 10993–2009 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий»; «Ч. 2. Требования к обращению с животными»; ГОСТ ISO 10993–2011. Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий; «Ч. 1. Оценка и исследования»; «Ч. 3 Исследование генотоксичности, канцерогенности и токсического действия на репродуктивную функцию»; «Ч. 4 Исследование изделий, взаимодействующих с кровью»; «Ч. 5 Исследования на цитотоксичность: методы *in vitro*»; «Ч. 6 Исследование местного действия после имплантации»; «Ч. 10 Исследование раздражающего и сенсибилизирующего действия»; «Ч. 11 Исследование общетоксического действия»; «Ч. 12. Приготовление проб и контрольные образцы»; ГОСТ Р 52770–2007 «Изделия медицинские. Требования безопасности. Методы санитарно-химических и токсикологических испытаний»; ГОСТ Р 51148–98 «Изделия медицинские. Требования к образцам и документации, представляемым на токсикологические, санитарно-химические испытания, испытания на стерильность и пирогенность»; ГФ XII. ОФС 42-0061-07. Пирогенность.

Для оценки показателей, характеризующих функциональное состояние органов и систем организма в эксперименте на крысах, использовали следующий перечень тестов:

интегральные показатели (внешний вид, поведение животных, состояние кожных покровов и слизистой, шерсти, потребление пищи и воды); функции печени оценивались по показателям: активность аланиновой трансаминазы (АЛТ, Ед/л), аспарагиновой трансаминазы (АСТ, Ед/л), щелочной фосфатазы (ЩФ, Ед/л), содержание креатинина (мг/дл). Рассчитывали также коэффициент де Ритиса (отношение аспарагиновой к аланиновой трансаминазе) как диагностический критерий. Выбор тестов был определен необходимостью оценить состояние систем и органов, отвечающих за метаболизм, детоксикацию и спо-

собность к элиминации. Все биохимические показатели определяли на полуавтоматическом фотометрическом анализаторе «Stat Fax 1904 Plus» в комплексе с проточной кюветой «Mosquito 2400» производства фирмы «Awarenes Technology inc», США. Гематологические показатели периферической крови: содержание гемоглобина, подсчет числа эритроцитов определяли на анализаторе «Stat Fax 1904 Plus», подсчет лейкоцитов в камере Горяева при помощи микроскопов МБИ-15, «ЛОМО», СССР и Olympus CX41RT с видеокамерой EVS color VEC-335. Цветной показатель определяли с помощью СФ HITACHI U-2800, «Hitachi». Морфологическую оценку токсического и общераздражающего воздействия препарата проводили на серийных срезах внутренних органов, залитых в парафин и окрашенных гематоксилином и эозином по стандартной методике.

Возможное аллергенное действие материалов изучали в опыте на белых крысах с применением провокационной внутрикожной пробы и проведении серологической диагностической реакции с сывороткой крови с целью выявления наличия комплекса «антиген-антитело» по реакции дегрануляции тучных клеток (РДТК). При наличии сенсибилизирующего эффекта у испытуемого материала в месте введения аллергена образуются гиперемия, отек, папула, шелушение кожи, реакция воспаления (воспаления), инфильтраты, некроз. Дополнительным тестом при оценке сенсибилизирующего действия служило определение коэффициента массы иммунокомпетентных органов (тимуса и селезенки) и их соотношение. Контролем служили крысы, которым в аналогичных условиях вводили стерильный физиологический раствор. По окончании эксперимента животных умерщвляли путем декапитации, изучали гематологические и биохимические показатели крови, определяли весовые коэффициенты внутренних органов по формуле:

$$K = \frac{M_{\text{органа, мг}}}{M_{\text{тела, г}}}$$

Статистическая обработка результатов наблюдений проводилась с использованием компьютерной программы вычисления оценки среднеквадратического отклонения результатов измерения от нормального распределения и вычисления доверительных границ погрешности результатов измерений. В таблицах с результатами испытаний приведены значения  $M \pm m$ .

**Результаты и обсуждение.** Изучение возможного токсического действия проводили в условиях подкожной имплантации материала ГИАЛРИПАЙЕР-02 в разрешающей дозе для человека (4,5 мл), в пересчете на массу одного животного (0,02 мл), белым крысам-самкам. Наблюдение за животными через 30 мин после введения разрешающей дозы, через 24 ч эксперимента не выявило наличия аллергической реакции – гиперчувствительности замедленного типа. На протяжении всего периода наблюдения (21 день) не отмечено гибели опытных животных, изменений внешнего вида, поведения, поедаемости корма, двигательной активности по сравнению с контрольной группой животных. При обследовании животных с помощью лабораторных методов исследования изменений гематологических и

Таблица 1

**Состав ГИАЛРИПАЙЕР-02**

Состав ГИАЛРИПАЙЕР-02	Масс. %	Производство
Гиалуронат натрия	0,5–0,7	Shiseido CO., LTD Kakegawa factory, Япония
Мод. ГК с витамином С фосфат Mg	0,3–0,8	ТУ 9358-005-12466809-98 (ФСЦ 42-0093-0221-00)
Глицин	0,1–0,3	ГОСТ 5860
Пролин-L	<b>0,1–0,3</b>	Рангас, Испания
Лизин-L-монохлорид	<b>0,1–0,3</b>	ТУ 6-09-4077-79
Хлористый натрий	0,1–0,2	Amresco, Германия
Фосфатный буфер	1,0	Amresco, Германия
Вода дистиллированная	до 100	ВФС 42-2619-76

биохимических показателей не выявлено.

Результаты обследования животных с помощью лабораторных методов исследования приведены в таблицах 2, 3.

Как следует из результатов, приведенных в таблицах 2–4, обследование животных с помощью методов лабораторного исследования не выявило отличий в изучавшихся показателях у опытных крыс по сравнению с контролем.

По результатам эксперимента с использованием провокационной внутрикожной пробы, сенсibilизирующего действия вытяжек из образцов, о наличии которого судили по РДТК, и раздражающего действия на кожу не обнаружено. РДТК составила 3,2 и 3,6% при значении показателя 10–15%, рассматриваемом как слабая реакция. На вскрытии животных макроскопически не выявлено патологических изменений внутренних органов и тканей подопытных животных. Образцы материала заключены в тонкие прозрачные соединительно-тканые капсулы без признаков воспаления. Коэффициенты массы внутренних органов, в том числе иммунокомпетентных (тимус, селезенка), опытных животных не имеют статистически достоверных отличий от аналогичных показателей контроля. Вытяжки из образцов не проявили гемолитического действия в опытах *in vitro* с изолированными эритроцитами кроликов: гемолиз 0,11 и 0,15% при допустимом значении показателя менее 2%.

Результаты проведенных исследований показали, что нет различий в изученных показателях органов и систем, отвечающих за детоксикационную функцию печени и выделительную функцию почек, у животных при воздействии материала ГИАЛРИПАЙЕР-02.

Анализируя все показатели, по которым оценивали сенсibilизирующее действие гелевого материала: отрицательная провокационная внутрикожная проба, значения показателя дегрануляции тучных клеток, равные 3,2 и 3,6%, отсутствие отличий от контроля весовых коэффициентов иммунокомпетентных органов – тимуса и селезенки и соотношения показателей весовых коэффициентов тимус/селезенка, можно сделать вывод о том, что изученные материалы не обладают аллергенным действием.

Оценивая морфологическую структуру внутренних органов лабораторных животных, можно сделать следующее заключение: ГИАЛРИПАЙЕР-02 не обладает местным раздражающим эффектом. Токсического воздействия на внутренние органы лабораторных животных не оказывает.

**Заключение.** Результаты проведенных исследований не выявили изменений в гематологических, биохимических и иных показателях, характеризующих состояние жизненно важных систем и органов у животных, подвергавшихся воздействию исследуемых соединений, что позволяет сделать вывод о возможности применения изученных материалов в косметологии для эстетической коррекции небольших дефектов лица (морщин, рубцов и т.д.), мезотерапии, биоревитализации, биорепарации, контурной пластики и в реконструктивной хирургии для замещения мягких тканей, в травматологии для замещения суставной жидкости. Материал гелевый на основе модифицированной гиалуроновой кислоты водосодержащий стерильный ГИАЛРИПАЙЕР-02 ТУ

9398-004-58568834-2009, организация-изготовитель ООО «Лаборатория ТОСКАНИ» нетоксичен, стерилен, отвечает требованиям нормативной документации.

Таблица 2

**Биохимические показатели сыворотки крови при изучении ГИАЛРИПАЙЕР-02**

КОНТРОЛЬ					
Показатель	АЛТ, Ед/л	$\frac{АСТ}{Ед/л}$	Коэффициент де Ритиса	ЩФ, Ед/л	Креатинин, мг/дл
М	44,23	219,38	4,86	120,11	0,59
m	3,66	14,77	0,31	7,88	0,21
ОПЫТ Материал ГИАЛРИПАЙЕР-02					
М	43,17	215,70	4,99	118,98	0,57
m	3,19	14,22	0,39	12,38	0,05

Таблица 3

**Гематологические показатели периферической крови крыс при изучении ГИАЛРИПАЙЕР-02**

<b>КОНТРОЛЬ</b>				
Показатель	L, тыс/мкл	Er, млн/мкл	Hb, г/л	Цветной показатель
M±m	7,31±0,87	5,65±0,25	168,13±4,12	0,95±0,01
<b>ОПЫТ Материал ГИАЛРИПАЙЕР-02</b>				
M±m	7,50±1,09	5,34±0,85	170,42±8,30	0,94±0,03

Значения относительной массы внутренних органов опытных и контрольных крыс приведены в таблице 4.

Таблица 4

**Масса тела и весовые коэффициенты внутренних органов крыс при изучении ГИАЛРИПАЙЕР-02**

Показатели	контроль	ГИАЛРИПАЙЕР-02
Масса тела	285,50±9,50	278,40±10,70
Тимус	1,15±0,15	1,34±0,17
Печень	30,96±1,46	31,23±1,79
Селезёнка	2,88±0,28	2,52±0,33
Тимус/селезёнка	0,46±0,08	0,57±0,10
Почки	5,96±0,06	6,14±0,08
Масса тела 1	286,75±10,70	279,20±11,70

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Carole E. Schante, Guy Zuber, Corinne Herlinb, Thierry F. Vandamme Chemical modifications of hyaluronic acid for the synthesis of derivatives for a broad range of biomedical applications // Carbohydrate Polymers. – 2011. – V. 85. – P. 469–489.
2. Хабаров В.Н., Бойков П.Я., Селянин М.А. Гиалуроновая кислота: получение, свойства, применение в биологии и медицине // Практическая медицина. М., 2012. – 224 с.
3. Хабаров В.Н., Селянин М.А., Михайлова Н.П., Зеленский А.Н. Биоактивные композиции на основе модифицированной гиалуроновой кислоты // Вестник эстетической медицины. – 2009. – Т. 8, № 1. – С. 49–54.
4. Хабаров В.Н., Волков В.П., Зеленский А.Н. и др. Способ получения модифицированной аскорбиновой кислотой сшитой соли гиалуроновой кислоты и биоактивная композиция на её основе // Патент 2382050 РФ. 2010 г.

## REFERENCES:

1. Carole E. Schante, Guy Zuber, Corinne Herlinb, Thierry F. Vandamme Chemical modifications of hyaluronic acid for the synthesis of derivatives for a broad range of biomedical applications // Carbohydrate Polymers. – 2011. – V. 85. – P. 469–489.
2. Khabarov V.N., Boykov P.Y., Selyanin M.A. Hyaluronan: preparation, the properties, applications in biology and medicine // practical medicine. M., 2012. – 224s. (in Russian).
3. Khabarov V.N., Selyanin M.A., Mikhailova N.P., Zelenetsky A.N. Bioactive composition based on modified hyaluronic acid // Journal of Aesthetic Medicine. – 2009. – T. 8, № 1. – С. 49–54 (in Russian).
4. Volkov V.P. et al. Patent RU 2382050 C1. Method for preparing modified ascorbic acid of cross-linked hyaluronic acid salt and based bioactive composition. 2010 (in Russian).

A.V. Karamysheva<sup>1</sup>, G.V. Sor<sup>1</sup>, N.M. Perova<sup>1</sup>, M.V. Mnikhovich<sup>1</sup>, S.A. Uspenski<sup>2</sup>, P.L. Ivanov<sup>2</sup>,  
V.N. Khabarov<sup>2</sup>, M.A. Selyanin<sup>2</sup>

TOXICOLOGICAL EVALUATION OF BIOACTIVE COMPOSITIONS BASED  
ON HYALURONIC ACID MODIFIED WITH VITAMINS AND AMINO ACIDS

<sup>1</sup>Federal State Budgetary Institution «All-Russian Scientific-Research and Testing Institute of Medical Engineering», Federal Service for Surveillance in Healthcare, 115478, Moscow, Russian Federation  
<sup>2</sup>Autonomous Noncommercial Organization «International Research Center for Innovative Technologies MARTINEX», 111123, Moscow, Russian Federation

Experimental studies of the biological action of the preparation (Hyalrepair-02) based on hyaluronic acid or its salt modified with ascorbic acid and amino acids were carried out in white rats. It was established that the drug did not produce any adverse effects on the animals organism: haematological, biochemical and other indicators characterizing the state of systems and organs of animals exposed to test compounds had no statistically significant differences from similar control indicators. Based on the first stage of the studies, it could be said that this non-toxic compound may be used in cosmetics to treat minor facial defects to be aesthetically corrected (wrinkles, scars, etc.), in mesotherapy, biorevitalisation, bioreparation, contouring plastics and reconstructive surgery to replace soft tissues in traumatology for joint fluid replacement.

**Key words:** hyaluronic acid, ascorbic acid, amino acids, Hyalrepair, toxicity.

Материал поступил в редакцию 21 апреля 2014 г.

# ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ ТОКСИКОЛОГИЯ

УДК: 628.394.6:57/.59

## ОЦЕНКА ТОКСИЧНОСТИ ПРЕПАРАТА MAX PLEX ДЛЯ ГИДРОБИОНТОВ

А.С. Федотов

Федеральное агентство по рыболовству  
Федеральное государственное унитарное предприятие  
Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и  
океанографии (ФГУП «ВНИРО»), 107140, Москва, Российская Федерация

**В** настоящее время проводятся крупномасштабные разработки нефти и газа на шельфе морей России. В связи с этим необходимо знать токсичность применяемого препарата MAX PLEX на буровых платформах, поскольку существует реальная возможность попадания остаточных количеств его в водоемы, что может нанести ущерб водным биоресурсам. Исследование токсичности препарата проведено в соответствии с «Руководством по определению методом биотестирования токсичности вод, донных отложений, загрязняющих веществ и буровых растворов». Оценка токсичности препарата проведена по определению медианных летальных концентраций ( $EC_{50}$  и  $LK_{50}$ ), характеризующих изменение выживаемости (гибели) стандартных морских тест-организмов (фитопланктона – *Phaeodactylum tricorutum Bohin*; зоопланктона – *Artemia salina* и рыб, односуточных мальков – *Poecilia reticulata Peters*) на 50% за определенное время – 72; 48 и 96 часов ( $EC_{50}/72$  ч и  $LK_{50}/48$  и 96 ч). По результатам оценки токсичности препарата для гидробионтов установлен наиболее чувствительный тест-объект – *Phaeodactylum tricorutum Bohin*, для которого  $EC_{50}/72$  ч = 8,3 мг/л. Согласно классификации Л.А. Лесникова и К.К. Врочинского по степени острой токсичности для водных организмов препарат MAX PLEX относится к среднетоксичным веществам ( $LK_{50}$  для фитопланктона за 72 ч составляет 8,3 мг/л).

**Ключевые слова:** препарат, фитопланктон, зоопланктон, рыба, токсичность.

**Введение.** В настоящее время проводятся крупномасштабные разработки нефти и газа на шельфе морей России, особенно в районе северных и дальневосточных морей, а также Северном Каспии. В связи с этим необходимо знать как токсичность применяемых буровых растворов и их компонентов, так и токсичность веществ, используемых на платформах для различных технологических целей, поскольку существует реальная возможность попадания их в водоемы, что может нанести определенный ущерб водным биоресурсам. Поэтому необходима оценка токсичности применяемых химических веществ на водоемах, путем определения медианных летальных концентраций ( $LK_{50}$ ), для сохранения водной экосистемы.

**Актуальность:** впервые дана оценка токсичности препарата MAX PLEX для водных объектов, имеющих рыбохозяйственное значение.

**Цель работы:** оценка токсичности препарата MAX PLEX для стандартных морских тест-объектов.

**Задачи:** оценка токсичности препарата для фитопланктонных организмов – *Phaeodactylum tricorutum Bohin*; оценка токсичности препарата для зоопланктонных организмов – *Artemia*

*salina*; оценка токсичности препарата для рыб, односуточных организмов (мальков) – *Poecilia reticulata Peters*.

**Материал и методы.** Препарат MAX PLEX предназначен для применения в нефтедобывающей промышленности и представляет собой порошок темного цвета без запаха [3].

Исследование токсичности препарата проводили в соответствии с «Руководством по определению методом биотестирования токсичности вод, донных отложений, загрязняющих веществ и буровых растворов» (утверждено МПР России, 27 апреля 2001 г., изд. РЭФИ, НИА-Природа, М., 2002 г [5]). Руководство включено в область аккредитации лаборатории.

Все исследования проведены в лабораторных условиях ВНИРО на искусственной морской воде соленостью 20‰.

Для исследований на фитопланктоне в качестве стандартного морского тест-объекта использовали альгологически чистую культуру морских одноклеточных диатомовых водорослей – *Phaeodactylum tricorutum Bohin*. В опыт брали культуру в экспоненциальной фазе роста. Начальная плотность клеток в эксперименте 20 000 тыс. кл./мл. Длительность опыта 3 суток

(72 ч), повторность трехкратная, освещение 3000 лк, температура 20±2°C, 12-часовой световой режим в климатостате.

Для определения пригодности культуры одноклеточных водорослей для биотестирования определяли ЛК<sub>50</sub> (96 ч) стандартного вещества K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> для *Ph. tricornutum*. ЛК<sub>50</sub> K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> равна 5,8 мг/л, что укладывается в диапазон реагирования для данного вида водорослей (4,8–6,7 мг/л).

На фитопланктонных организмах в течение трех суток исследовали изменение флуоресценции клеток водорослей при различных концентрациях препарата. Определяли полуэффективную концентрацию препарата (ЭК<sub>50</sub> за 72ч) [1]. Полуэффективная концентрация (ЭК<sub>50</sub>) препарата вызывает изменение параметров жизнедеятельности фитопланктонных организмов (изменение численности клеток, изменение флуоресценции хлорофилла клеток и др.) на 50% за определенное время. Показатели жизнедеятельности микроводорослей оценивали экспресс-методом по изменению флуоресценции клеток водорослей на приборе «Флюорат 02-3М». Определение изменения численности клеток проводили в камере Горяева под микроскопом. Численность живых клеток водорослей коррелировала с показаниями флуоресценции водорослей. В эксперименте замеры флуоресценции клеток проводили ежедневно.

Для исследований на зоопланктонных организмах использовали стандартный морской тест-объект – эвригалинные жабронные рачки *Artemia salina*. В опыт брали односуточных рачков, длительность эксперимента – 2 и 4 суток (48 и 96 ч). В остром эксперименте рачков не кормили.

Для определения пригодности культуры артемий для биотестирования определяли ЛК<sub>50</sub> (72 ч) стандартного вещества K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> для артемий. ЛК<sub>50</sub> равна 7,1 мг/л, что укладывается в диапазон реагирования артемий (6,9–8,0 мг/л) на стандартное вещество.

Определяли полулетальные концентрации (ЛК<sub>50</sub>/48 и 96ч) препарата [4]. Полулетальные концентрации (ЛК<sub>50</sub>) вызывают изменение выживаемости зоопланктонных организмов (гибель) на 50% за 48 и 96 ч.

Для проведения ихтиотоксикологических исследований используется широко распростра-

ненная аквариумная живородящая рыбка – *Poecilia reticulata* Peters – гуппи. Гуппи выдерживают значительные колебания солености, в природе встречаются как в пресных, так и осолоненных водах.

В опыте использовали высокочувствительных односуточных мальков данных рыб. Исследование препарата проводили в аквариальной, с использованием рассеянного света и естественного светового периода. Длительность биотестирования водной вытяжки составляла 4 суток (96 ч). Во время биотестирования рыб не кормили. Температура анализируемой пробы 20–22°C, концентрация растворенного кислорода 8,6 мг/дм<sup>3</sup>. 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 двухромовокислороду. ЛК<sub>50</sub> K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> за 24 ч составила 127,0 мг/дм<sup>3</sup> (что укладывается в диапазон требуемых концентраций 106–175 мг/дм<sup>3</sup>).

Определяли полулетальную концентрацию (ЛК<sub>50</sub>/96 ч) препарата [4]. Полулетальные концентрации (ЛК<sub>50</sub>) вызывают изменение выживаемости односуточных мальков рыб (гибель) на 50% за 96 ч.

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

Степень острой токсичности препарата для гидробионтов оценивали согласно классификации Лесникова Л.А. и Врочинского К.К. [2].

**Результаты и обсуждение.** Согласно представленным в таблице 1 данным видно, что концентрация препарата MAX PLEX 0,5 мг/л не оказывает токсического влияния на жизнедеятельность фитопланктона. Концентрации 1,0–100,0 статистически достоверно угнетают развитие фитопланктона, снижая уровень флуоресценции от 10 до 100%. Показатели флуоресценции водорослей в концентрации 0,5 мг/л находились на уровне контрольных величин на протяжении всех суток исследования.

Расчетная полуэффективная концентрация препарата MAX PLEX за трое суток (ЭК<sub>50</sub>/72ч) составила 8,3 мг/л.

Из представленных в таблице 2 данных видно, что в концентрациях препарата MAX PLEX

Таблица 1

**Показатели жизнедеятельности *Phaeodactylum tricornutum* Bohin (изменение флуоресценции хлорофилла клеток) в различных концентрациях препарата MAX PLEX, экспозиция 72 ч**

Концентрация, мг/л	Сутки опыта		
	1	2	3
Контроль	0,25	0,37	0,80
0,5	0,25	0,37	0,80
1,0	0,24	0,33	0,72
5,0	0,22	0,28	0,62
10,0	0,16	0,16	0,32
50,0	0,05	0,05	0,08
100,0	0,02	0,01	–
% от контроля			
Контроль	100	100	100
0,5	100	100	100
1,0	96	89	90
5,0	89	76	77
10,0	63	43	40
50,0	21	14	10
100,0	8	2	–

0,05 и 0,1 мг/л не отмечено гибели артемий в течение 4 суток. Концентрация 1,0 мг/л вызывает единичную статистически недостоверную гибель рачков (5%). Максимальная статистически достоверная гибель организмов зарегистрирована в концентрациях препарата 5,0–100,0 мг/л, что составило 20–100%.

Расчетные полудетальные концентрации препарата MAX PLEX для артемий за 2 и 4 суток ( $LK_{50}/48$  и 96 ч) составили соответственно >100,0 и 45,5 мг/л.

Из представленных в таблице 3 данных видно, что концентрация препарата MAX PLEX 500,0 мг/л на 4-е сутки опыта вызывает 100% гибель мальков гуппи. В концентрациях 5,0–100,0 мг/л на 4-е сутки выживают соответственно 83,3–33,3% мальков рыб по сравнению с контролем. В концентрации 1,0 мг/л гибель односуточных мальков не отмечена на протяжении всего эксперимента.

Расчетная полудетальная концентрация препарата MAX PLEX за 96 ч ( $LK_{50}/96ч$ ) для мальков рыб равна 39,5 мг/л.

Представленные в таблице 4 обобщенные данные свидетельствуют о том, что для препарата MAX PLEX наиболее слабым тест-организмом из трех исследованных (фито-, зоопланктон, рыбы) являются фитопланктонные организмы – *Phaeodactylum tricoratum Bohlin*, для которых получена наименьшая полудетальная концентрация 8,3 мг/л.

**Заключение.** Согласно классификации Л.А. Лесникова и К.К. Врочинского [5] по степени острой токсичности для водных организмов препарат MAX PLEX оценивается как среднетоксичный ( $LK_{50}$  для фитопланктона за 72 ч составляет 8,3 мг/л, что соответствует интервалу концентраций от 5,0 до 50,0 мг/л).

В таблице 4 дополнительно внесена рассчитанная по экспериментальным данным для зоопланктона  $LK_{50}/48$  ч (учитывая требования Федерального закона от 21.06.1997 г 116-ФЗ «О промышленной безопасности опасных производственных объектов (с изме-

нениями от 07.08.2000 г., 10.01.2003 г.).

Таблица 2

**Динамика выживаемости *Artemia salina* в различных концентрациях препарата MAX PLEX, экспозиция 96 ч, n = 20**

Концентрация мг/л	Сутки опыта			
	1	2	3	4
Контроль	20	20	20	20
0,05	20	20	20	20
0,1	20	20	20	20
1,0	20	20	20	19
5,0	20	20	19	16
10,0	20	20	18	14
50,0	20	20	15	9
100,0	20	20	8	0
% от контроля				
Контроль	100	100	100	100
0,05	100	100	100	100
0,1	100	100	100	100
1,0	100	100	100	95
5,0	100	100	95	80
10,0	100	100	90	70
50,0	100	100	75	45
100,0	100	100	40	0

Таблица 3

**Динамика выживаемости (%) односуточных *Rosselia reticulata* Peters в различных концентрациях препарата MAX PLEX, экспозиция 96 ч, n = 30**

Концентрация, мг/л	Сутки опыта			
	1	2	3	4
Контроль	30	30	30	30
1,0	30	30	30	30
5,0	30	30	28	25
10,0	30	29	25	22
50,0	28	26	22	19
100,0	24	21	17	10
500,0	21	16	6	0
% от контроля				
Контроль	100	100	100	0
1,0	100	100	100	100
5,0	100	100	93,3	83,3
10,0	100	96,7	83,3	73,3
50,0	93,3	86,7	73,3	63,3
100,0	80,0	70,0	56,7	33,3
500,0	70,0	53,3	20,0	0

**Обобщенные данные результатов исследования токсичности препарата  
MAX PLEX для гидробионтов**

Название препарата	Фитопланктон (ЭК <sub>50</sub> /72 ч), мг/л	Зоопланктон ЛК <sub>50</sub> /48 ч/96 ч, мг/л	Рыба (односуточные группы), ЛК <sub>50</sub> /96 ч, мг/л	Слабое звено
MAX PLEX	8,3	>100,0/45,5*	39,5	Фитопланктон (ЭК <sub>50</sub> /72 ч 8,3 мг/л)

Примечание: \*числитель ЛК<sub>50</sub>/48 ч, знаменатель ЛК<sub>50</sub>/96 ч

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. *Беленький М.Л.* Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. – Рига: Изд. АН Латвийской ССР, 1963.
2. Методические указания по рыбохозяйственной оценке пестицидов. – Л.: ГосНИОРХ, 1973.
3. Паспорт безопасности вещества (материала) MAX PLEX. – М: Компания «Бейкер-Хьюз», 2009.
4. *Прозоровский В.Б.* Использование метода наименьших квадратов для пробит-анализа кривых летальности. В кн.: Фармакология и токсикология. – М.; 1962.
5. Руководство по определению методом биотестирования токсичности вод, донных отложений, загрязняющих веществ и буровых растворов: Утв. МПР России 27 апреля 2001 г. – М.; РЭФИ, НИИ-Природа, 2002 г.

**REFERENCES:**

1. *Belenky M.L.* Elements of quantitative assessment of pharmacological effect. – Riga: publishing AN Latviskoi SSR; 1963 (in Russian).
2. Guidelines for fisheries assessment of pesticides. – L: GosNIORH, 1973 (in Russian).
3. Material Safety Data Sheet MAX PLEX. – М: «Baker Hughes» company, 2009.
4. *Prozorovsky V.B.* Using the least squares method for probit analysis of mortality curves. – Pharmacology and toxicology. М., 1962 (in Russian).
5. Guidance on the determination method of toxicity biotesting water, bottom sediments, pollutants and drilling muds: approved by the Russian Ministry 27.04.2001. – М., RAFI, NIA of Natural Resources, 2002 (in Russian).

A.S. Fedotov

**ASSESSMENT OF THE TOXICITY OF SUBSTANCE MAX PLEX TO HYDROBIONTS**

Federal State Unitary Enterprise «Russian Federal Research Institute of Fisheries and Oceanography (VNIRO)», Federal Agency for Fisheries, 107140, Moscow, Russian Federation

At present a large-scale oil and gas development work is carried out on the Russian sea shelf. Therefore it is necessary to know toxicity of the preparation MAX PLEX used on drilling platforms as there is a real possibility that its residual quantity could get in the soil posing harm to biological water resources. The preparation toxicity was assessed in accordance with «The Guidelines for determining toxicity of water, bottom deposits, pollutants, drilling fluid fluids using a biotesting method». Toxicity assessment was based on determining mean lethal concentrations EC<sub>50</sub> and LC<sub>50</sub> characterizing changes in survival (death) of standard sea test-organisms (*Phytoplankton *Phaeddactylum tricorutum* Bohin*, zooplankton- *Aryemia salina*, fishes, one-day old fishes- *Poecillia reticulata* Peters) by 50% for a determined time period- 72, 48 and 96 hours (EC<sub>50</sub>/72h and LC<sub>50</sub>/48 and 96 h). Based on toxicity assessment of the preparation for hydrobionts, it was established that the most sensitive test-object is *Phaeddactylum tricorutum Bohin* having EC<sub>50</sub>/72h= 8.3 mg/l. According to the classification proposed by L.A. Lesnikov and K.K. Vrochinskiy, based on grading of acute toxicity to hydrobionts, the preparation MAX PLEX is classified as moderately toxic (for phytoplankton LC<sub>50</sub> is 8.3 mg/l during 72h).

**Key words:** preparation, phytoplankton, zooplankton, fish, toxicity.

Материал поступил в редакцию 11.06.2014 г.

# ИНАКТИВАЦИЯ ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ БИХРОМАТА КАЛИЯ ШУНГИТОМ НА РАЗВИТИЕ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ

Г.А. Даллакян, С.И. Погосян,

В.И. Ипатова, И.В. Агеева

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

**И**зучали влияние шунгита из расчета 100 г/л и бихромата калия в концентрации 3 мг/л на культуру зеленой хлорококковой микроводоросли *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Bréb. В присутствии шунгита наблюдали стимуляцию роста культуры, а в присутствии бихромата калия происходило угнетение ее роста по сравнению с контролем. Показано, что при комбинированном воздействии бихромата калия и шунгита на популяцию *Scenedesmus quadricauda* токсические действие бихромата калия снимается. Наиболее быстрый рост культуры происходил, когда в культуральную среду был добавлен только шунгит, при этом эффективность фотосинтеза, численность клеток и доля живых клеток в присутствии шунгита в среде увеличивались. По-видимому, шунгит в культуральной среде действует, с одной стороны, как сорбент, а с другой – изменяет окислительно-восстановительное состояние среды. Механизм действия шунгита неспецифичен и его можно использовать как универсальное средство для очистки воды от различных загрязняющих веществ.

**Ключевые слова:** *Scenedesmus quadricauda*, бихромат калия, шунгит, жизнеспособность клеток, флуоресценция, эффективность фотосинтеза.

**Введение.** Многие токсиканты, как природного, так и антропогенного происхождения, могут приводить к стрессу или гибели водных организмов. При этом механизмы их токсического действия на организмы различаются. Они могут снижать темп деления клеток, снижать эффективность фотосинтеза, усиливать окислительные процессы в организме и влиять на другие жизненно важные процессы в клетках. В связи с этим возникает необходимость поиска новых, в том числе и универсальных способов инактивации этих соединений, действующих по разному механизму. Как было показано нами ранее [1], повреждающее действие синглетного кислорода, образующегося в присутствии фотосенсибилизаторов, можно инактивировать с помощью шунгита.

Природный композит шунгит в основном состоит из аморфного, глобулярного, фуллереноподобного углерода. В Жакогинской породе Карелии его доля составляет 30 %, а остальная часть приходится на силикатные минералы, равномерно распределенные в углеродной матрице, и минеральные включения кремния, алюминия, железа, магния, калия, серы, кальция, фосфора и др. [2]. Фуллерен был обнаружен в шунгитах Карелии в 1992 г. [3]. Известно, что фуллерены могут встраиваться в биологические мембраны, влиять на их структуру, изменять каталитическую активность мембранных ферментов. При этом механизмы биологического действия фуллеренов зависят от их агрегатного состояния [4, 5]. Разнонаправленное действие фуллеренов на биологические объекты объясняется особыми свойствами водных сферических оболочек этих соединений [6].

Способность шунгита очищать воду известна давно. Первые фильтры для очистки воды на основе шунгита были созданы в 1995 г. Показано, что вода, пропущенная через шунгит, обладает благоприятным действием на многие организмы. Однако действие шунгита на различные

биологические объекты изучено недостаточно, особенно в присутствии в среде разных токсических соединений, в том числе и тяжелых металлов. В настоящей работе рассмотрен один из важных вопросов, имеющий научно-практическое значение, – способность шунгита снижать токсическое действие тяжелых металлов (на примере бихромата калия).

**Целью настоящей работы** было исследование структурных и физиологических параметров роста популяции микроводоросли *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Bréb. в накопительном режиме культивирования при комбинированном действии бихромата калия и шунгита.

**Материалы и методы исследования.** Объектом исследования была альгологически чистая культура *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Bréb., которую выращивали в конических колбах объемом 100 мл в среде Успенского №1 при температуре 25 °С и круглосуточном освещении 15 мкмоль квантов м<sup>-2</sup>с<sup>-1</sup>.

В экспериментах использовали шунгит с Жакогинского месторождения от компании «Арго» и бихромат калия (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>), широко используемый в международной практике токсикологических исследований как эталонный токсикант. Шунгит из расчета 100 г/л и бихромат калия в концентрации 3 мг/л добавляли в среду однократно на 3-й день после посева культуры. Шунгит предварительно обрабатывали согласно инструкции изготовителя с учетом специфики выращивания водорослей. Для этого гранулы шунгита промывали холодной водой, затем высыпали в 3-литровую стеклянную банку и настаивали в воде в течение 2 суток, после чего снова промывали дистиллированной водой для удаления посторонних примесей и автоклавились при 1 атм. 30 мин. После обработки шунгит добавляли в культуральную среду.

Численность клеток подсчитывали в камере Горяева под световым микроскопом. Определение живых и мертвых клеток в культуре осуществляли с помощью люминесцентного ми-

**Даллакян Генарис Арменакович (Dallakyan Genaris Armenakovich)**, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник кафедры гидробиологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, honaris@bk.ru

**Погосян Сергей Иосифович (Pogosyan Sergei Iosifovich)**, доктор биологических наук, профессор кафедры биофизики биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Pogosyan@biophys.msu.ru

**Ипатова Валентина Ивановна (Ipatova Valentina Ivanovna)**, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник кафедры гидробиологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, viipatova@hotmail.com

**Агеева Ирина Вадимовна (Ageeva Irina Vadimovna)**, научный сотрудник кафедры гидробиологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, ageev@phys.chem.msu.ru

микроскопа Carl Zeiss Axioscop 2 FS Plus в проходящем свете. При облучении объекта короткими сине-фиолетовыми лучами получали длинноволновое видимое свечение объекта: живые клетки имели ярко-красное свечение, а мертвые – зеленое. Интенсивность флуоресценции хлорофилла рассчитывали по показателям Fo и Fm, которые измеряли на приборе «МЕГА-25» [7]. Контролем служил рост водорослей в чистой среде без добавления шунгита и бихромата калия.

Эксперименты проводили в трех повторностях длительностью 25 суток. Статистическую обработку результатов проводили в программе Excel-2003 с использованием пакета анализа данных, для чего рассчитывали доверительный интервал и критерий Стьюдента для уровня значимости 0,05.

**Результаты и обсуждение.** На рисунке 1 представлены данные по изменению численности клеток культуры *S. quadricauda* в присутствии шунгита (100 мг/л), бихромата калия (3 мг/л) и при их совместном присутствии в культуральной среде (100 мг/л шунгита+3 мг/л бихромата калия).

В присутствии шунгита наблюдали достоверную стимуляцию роста культуры до 15 суток по сравнению с ростом контрольной культуры в чистой среде. При воздействии бихромата калия происходило достоверное угнетение роста культуры по сравнению с контролем на протяжении всего 25-суточного эксперимента. Подавление развития водорослей в диапазоне концентраций 1–10 мг/л бихромата калия и выше описывается рядом исследователей [8, 9]. При этом токсичность разных соединений хрома отличается: наиболее токсичны соединения шестивалентного хрома [10], причем бихроматы более ядовиты, чем хроматы, а менее токсичны соединения трехвалентного хрома. Вредное влияние соединений хрома зависит не только от валентности хрома, но также от состава воды (содержание кислорода и органических веществ) и видовой устойчивости организмов.

В наших экспериментах мы исследовали изменение роста культуры при комбинированном воздействии шунгита и бихромата калия. При одновременном присутствии в среде шунгита и бихромата калия отклонения численности клеток от контроля были незначительными, что свидетельствует об инактивации токсического действия бихромата калия. Ранее в наших работах [11] было показано, что шунгит защищает от повреждающего действия фотодинамических красителей на популяцию клеток *S. quadricauda*. При этом шунгит дезактивирует синглетный кислород, образующийся от красителя, и тем самым защищает водоросли от его токсического действия. В этом процессе фуллереноподобные соединения, входящие в состав шунгита, проявляют себя как антиоксиданты [11]. В присутствии же бихромата калия в среде синглетный

кислород не образуется. Поскольку соединения шестивалентного хрома более токсичны, чем трехвалентного, одним из возможных механизмов защиты популяции водоросли *S. quadricauda* от токсического действия бихромата калия в присутствии шунгита является переход шестивалентного хрома в менее токсичный трехвалентный:  $K_2Cr_2^{VI}O_7 + Sh \rightarrow Cr_2^{III}Sh$ , где Sh – активные соединения, входящие в состав шунгита (ионы переменной валентности, фуллерены и др. соединения), восстанавливающие бихромат калия и снижающие его токсичность. Не исключается также возможность образования комплекса  $K_2Cr_2^{VI}O_7$  с шунгитом, который становится менее токсичным для микроводоросли.

Стимуляцию роста водоросли в присутствии шунгита по сравнению с ее ростом в чистой среде можно объяснить, в частности, тем, что шунгит восстанавливает различные окислители, сенсибилизаторы и др. соединения, входящие в состав метаболитов, переводя их в неактивное состояние. Таким свойством обладают фуллерены, входящие в состав шунгита. Фуллерен в составе шунгита находится в виде особых, полярных, донорно-акцепторных комплексов с другими химическими соединениями, при этом в шунгитах, в основном, присутствует фуллерен  $C_{60}$ , который составляет около 0,04% [12].

На рисунке 2 представлены результаты исследования жизнеспособности клеток *S. quadricauda*, оцененной с помощью метода люминесцентной микроскопии. В присутствии 3 мг/л бихромата калия количество живых клеток в культуре со временем постепенно уменьшалось, а доля мертвых – соответственно увеличивалась. В присутствии шунгита доля живых клеток в культуре была на уровне контроля. При комбинированном действии бихромата калия и шунгита доля живых клеток составляла 98–99% на протяжении всего эксперимента и к концу эксперимента была даже выше уровня контроля. Полученные результаты также свидетельствуют о снижении токсического действия бихромата калия на культуру *S. quadricauda* в присутствии шунгита.

Отношение начальной флуоресценции Fo к численности клеток N (Fo/N) служит косвенной характеристикой содержания пигментов на клетку.

Как видно из рисунка 3, количество пигментов в пробах шунгитом (2, 4) во время роста культуры всегда меньше, чем в пробах без него (1, 3). Это связано с тем, что в присутствии шунгита клетки *S. quadricauda* по размеру были меньше, чем в его отсутствие (что визуально было отмечено при подсчете клеток в камере Горяева под микроскопом), поскольку скорость деления клеток в среде с шунгитом была выше. По нашим наблюдениям, с первых дней после добавления шунгита в культуральную среду происходило изменение свойств среды, способ-

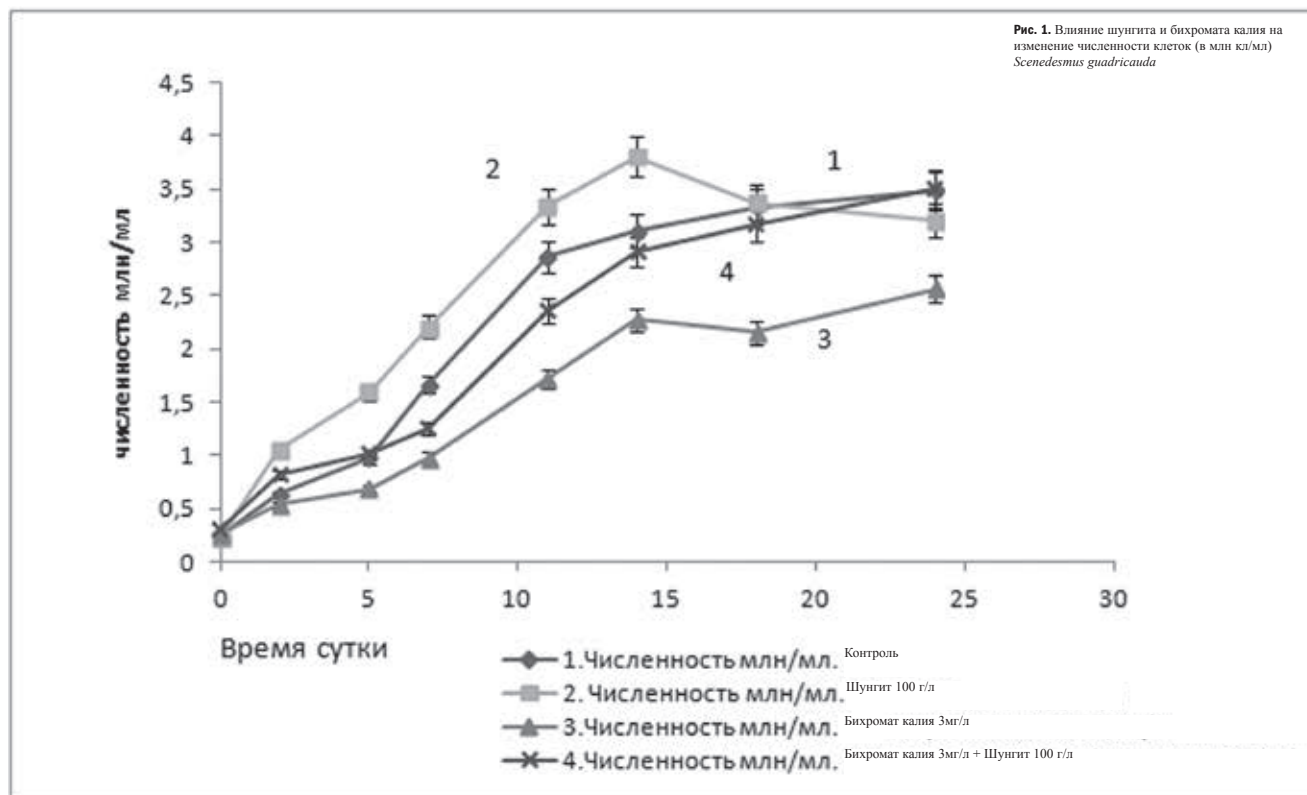


Рис. 1. Влияние шунгита и бихромата калия на изменение численности клеток (*Scenedesmus quadricauda*)

ствовавших благоприятному росту культуры микроводоросли. Относительно большое количество пигментов в пробах с бихроматом калия (рис. 3) связано с его токсическим действием. В присутствии бихромата калия часть клеток погибала (рис. 1, 2), а оставшиеся живые, более устойчивые к токсиканту, клетки имели более крупные размеры, поэтому содержание пигментов в расчете на клетку было больше. Увеличение размеров клеток и торможение темпа деления в присутствии бихромата калия было отмечено и в других работах [8, 13]. Содержание пигментов в контроле до 5-х суток было больше, чем в остальных пробах, поскольку в этот период происходит адаптация культуры к новым условиям после ее пересева в свежую среду, при этом деление клеток замедляется и клетки становятся большими по размеру. Начиная с 5-х суток скорость роста увеличивается, клетки делятся быстрее и поэтому уменьшаются в размерах, поэтому в контроле после 5-х суток содержание пигментов на клетку меньше, чем в присутствии бихромата калия.

На рисунке 4 представлены данные изменения фотохимического квантового выхода фотосистемы II или эффективности фотосинтеза  $\Psi = Fv/Fm$  (в %), рассчитанной по формуле  $\Psi = (Fm - F_0)/Fm$ , где  $Fm$  – интенсивность флуоресценции при закрытых реакционных центрах фотосистемы II [7]. Данные по эффективности фотосинтеза (рис. 4) хорошо согласуются с данными по общей численности клеток (рис. 1), а также доли живых клеток в культуре (рис. 2). Во всех случаях, как в присутствии шунгита, так и при одновременном присутствии в среде шунгита и бихромата калия, клетки водоросли растут лучше, при этом эффективность фотосинтеза, численность клеток и доля живых клеток становятся выше, чем в контроле или в присутствии в среде только бихромата калия. Эффективность фотосинтеза была наиболее низкой в пробах с бихроматом калия. Близкие значения (в пределах ошибки измерения) эффективности фотосинтеза после 10-х суток роста водорослей во всех пробах можно объяснить тем, что происходила адаптация культуры к условиям среды. Клетки с низкой эффективностью фотосинтеза элиминировались и в популяции оставались только клетки с высокой эффективностью фотосинтеза.

**Заключение.** Стимуляция роста культуры *S. quadricauda* в присутствии шунгита по сравнению с ростом культуры в чистой среде и улучшение роста *S. quadricauda* при комбинированном действии бихромата калия и шунгита, по сравнению с ее ростом в присутствии только бихромата калия, возможно, связано с тем, что шунгитовые соединения образуют комплекс с бихроматом калия и инактивируют его действие. Кроме того, фуллереноподобные соединения изменяют свойства воды. Шунгитовые фуллерены плохо растворяются в воде, однако, при настаивании в воде несколько часов вокруг каждого фуллерена образуется многослойная оболочка из молекул

воды, которую называют структурированной водой [4, 5], что создает условия для благоприятного роста культуры. Возможно, что во время роста культуры, когда количество экзометаболитов в среде увеличивается, шунгит выступает как сорбент и тем самым инактивирует ингибирующее действие метаболитов.

Таким образом, шунгит стимулирует рост численности популяции микроводоросли *Scenedesmus quadricauda*, но при этом происходит уменьшение размеров клеток и содержание пигментов в них. Шунгит инактивирует действие бихромата калия, при этом механизм действия шунгита неспецифичен, что указывает на его возможное использование как универсального средства для очистки воды от различных загрязняющих веществ.

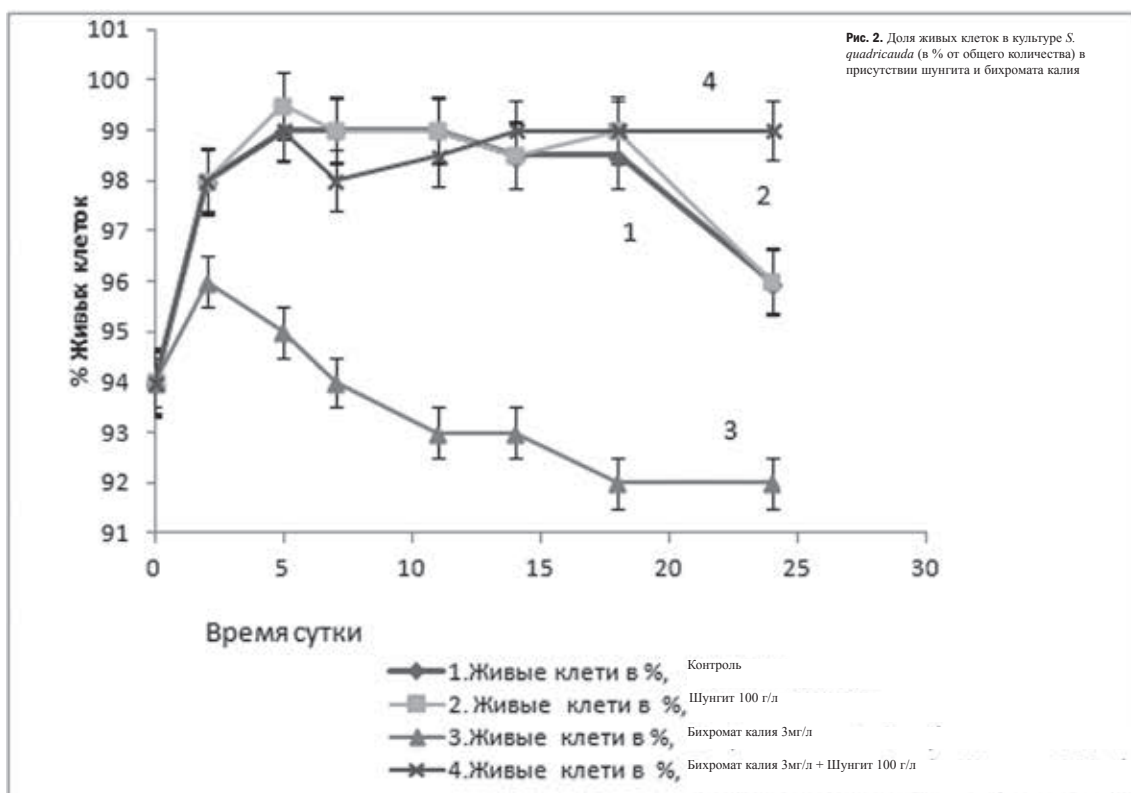
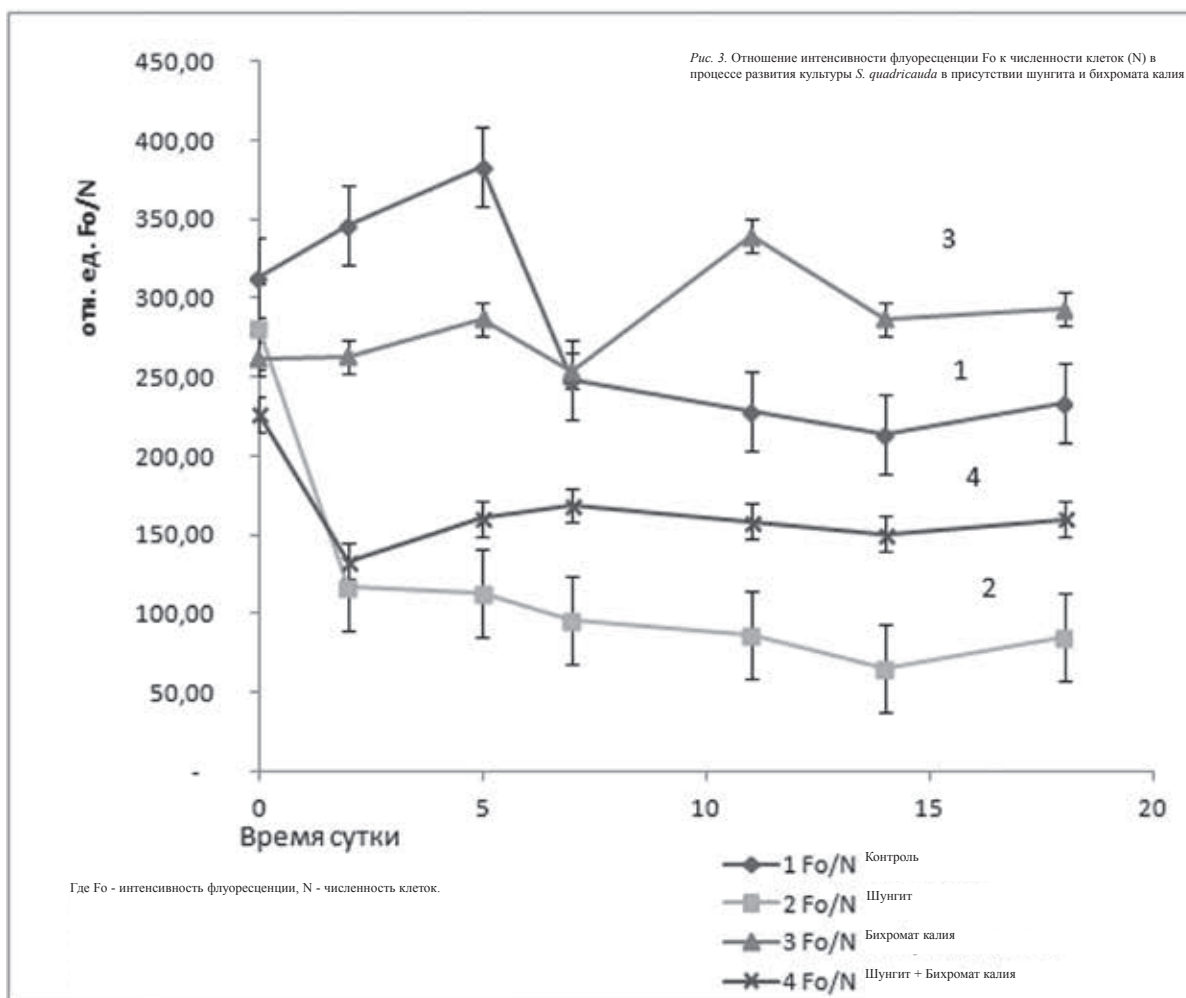
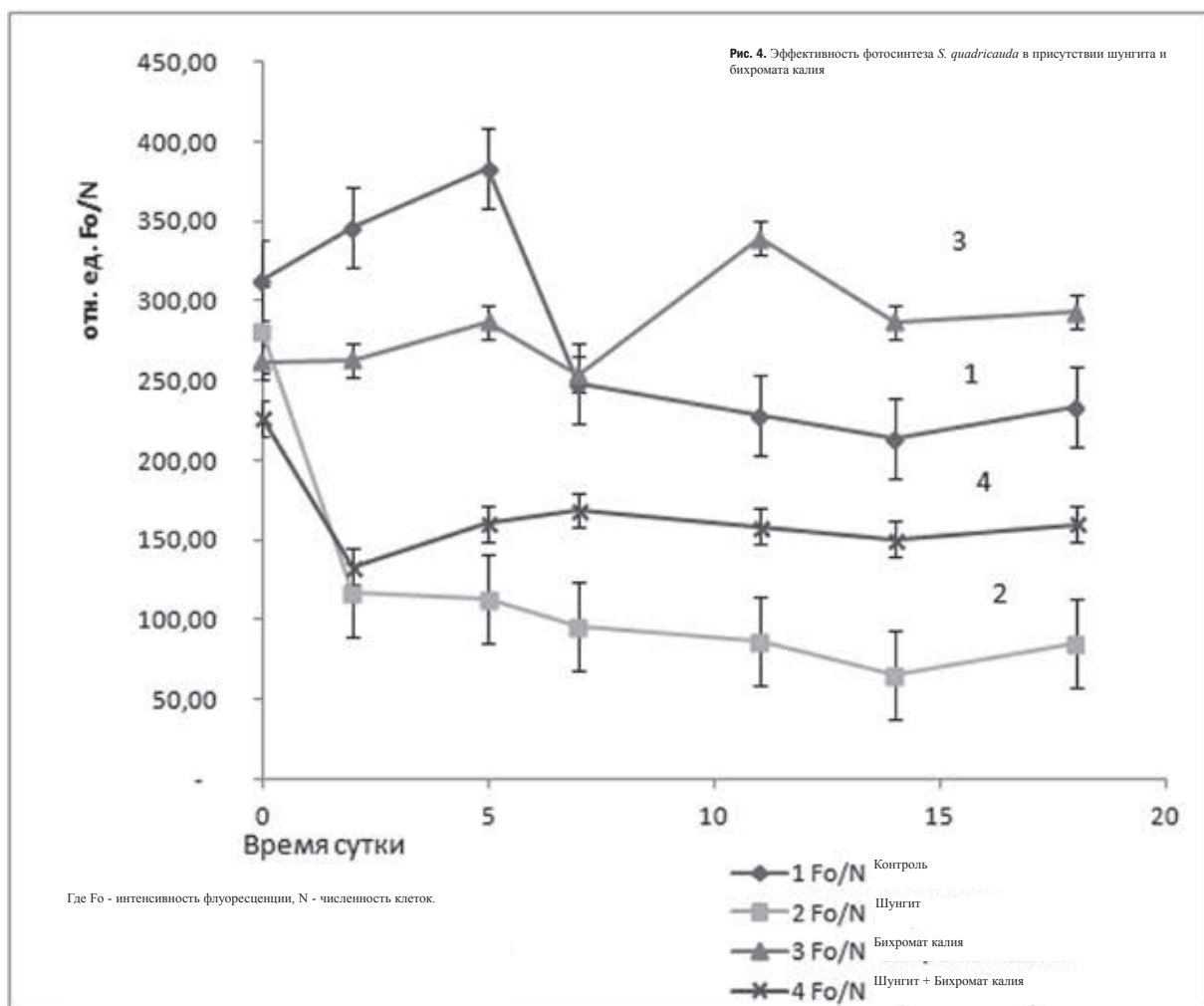


Рис. 2. Доля живых клеток в культуре *S. quadricauda* (в % от общего количества) в присутствии шунгита и бихромата калия





## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Даллакян Г.А. Рост популяции микроводорослей в условиях питательных сред, обогащенных синглетным кислородом. Известия РАН. Серия биол. 1998; 6: 751–753.
2. Каленин Ю.К. Экологический потенциал шунгита. Наука в России. 2008; 6: 39–44.
3. Buseck P.R., Tsipursky S.J., Hettich R. Fullerenes from the geological environment. *Science*. 1992; 257 (5067): 215–17.
4. Andrievsky G.V., Bruskov V.I., Tykhomyrov A.A., Gudkov S.V. Peculiarities of the antioxidant and radioprotective effects of hydrated C<sub>60</sub> fullerene nanostructures in vitro and in vivo. *Free Radical Biology Med.* 2009; 47: 786–793.
5. Пиотровский Л.Б., Еропкин М.Ю., Еропкина Е.М., Думпис М.А., Киселев О.И. Механизмы биологического действия фуллеренов – зависимость от агрегатного состояния. Психфармакол. биол. наркол. 2007; 7(2): 1548–1554.
6. Ширинкин С.В., Шапошников А.А., Волкова Т.О., Андриевский Г.В., Давыдовский А.Г. Гидратированный фуллерен как инструмент для понимания роли особых структурных свойств водной среды живого

организма для его нормального функционирования. Научные ведомости БелГУ, Серия Естественные науки. 2012; 9: 122–127. Available at: <http://cyberleninka.ru/article/n/gidratirovannyy-fulleren-kak-instrument-dlya-ponimaniya-rol-i-osobyh-strukturnyh-svoystv-vodnoy-sredy-zhivogo-organizma-dlya-ego>

7. Pogosyan S.I., Gal'chuk S.V., Kazimirko Ju.V., Konjukhov I.V., Rubin A.B. Применение флуориметра «МЕГА-25» для определения количества фитопланктона и оценки состояния его фотосинтетического аппарата. Вода: химия и экология. 2009; 6: 34–40.
8. Артюхова В.И., Дмитриева А.Г., Филенко О.Ф., Чжао Цзюнь. Изменение динамики роста культуры и размеров клеток *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Breb. при действии бихромата калия. Журн. Известия РАН. Серия Биологическая. 1997; 3: 280–286.
9. Прохощая В.Ю., Ипатова В.И., Дмитриева А.Г., Филенко О.Ф. Оценка степени адаптации лабораторной популяции *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Breb. к действию бихромата калия. Журн. Вестник московского ун-та. Серия 16. Биология. 2003; 3: 37–42.

10. Nriagu J.O., ed. *Aquatic Toxicology*. New-York: John Wiley & Sons. Inc.; 1983.
11. Даллакян Г.А., Агеева И.В., Братковская Л.Б. Влияние шунгита на функциональную активность микроводорослей *Scenedesmus quadricauda*. Вода: химия и экология. 2013; 10: 102–106.
12. Осипов Э. В., Калинин Ю.К., Резников В.А. Способ выделения фуллеренов из шунгита. Патент РФ, № 2270801; 2006.
13. Артюхова В.И., Дмитриева А.Г., Филенко О.Ф., Чжао Цзюнь. Последствие действия бихромата калия на культуру *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Breb. при изменении токсической нагрузки. Журн. Известия РАН. Серия Биологическая. 1997; 4: 440–445.

## REFERENCES:

1. Dallakyan G.A. Population growth of algae in culture media enriched with singlet oxygen. *Izvestija RAN. Serija biol.* 1998; 6: 751–753 (in Russian).
2. Kalenin Ju.K. Ecological potential of shungit. *Nauka v Rossii*. 2008; 6: 39–44 (in Russian).
3. Buseck P.R., Tsipursky S.J., Hettich R. Fullerenes from the geological environment. *Science*. 1992; 257 (5067): 215–217.
4. Andrievsky G.V., Bruskov V.I., Tykhomyrov A.A., Gudkov S.V. Peculiarities of the antioxidant and radioprotective effects of hydrated C<sub>60</sub> fullerene nanostructures in vitro and in vivo. *Free Radical Biology Med.* 2009; 47: 786–793.
5. Piotrovskij L.B., Eroptin M.Ju., Eroptina E.M., Dumpis M.A., Kiselev O.I. Mechanisms of biological action of fullerenes – dependence on the state of aggregation. *Psihofarmakol. biol. narkol.* 2007; 7(2): 1548–1554 (in Russian).
6. Shirinkin S.V., Shaposhnikov A.A., Volkova T.O., Andrievskij G.V., Davydovskij A.G. Hydrated fullerene as a tool for understanding the role of specific structural properties of the aquatic environment of the living

organism to its normal functioning. . *Nauchnye ведомosti BelGU, Serija Estestvennye nauki*. 2012; 9: 122–127. Available at: <http://cyberleninka.ru/article/n/gidratirovannyy-fulleren-kak-instrument-dlya-ponimaniya-rol-i-osobyh-strukturnyh-svoystv-vodnoy-sredy-zhivogo-organizma-dlya-ego> (in Russian).

7. Pogosyan S.I., Gal'chuk S.V., Kazimirko Ju.V., Konjukhov I.V., Rubin A.B. Application fluorometer «МЕГА-25» to determine the amount of phytoplankton and its assessment of the photosynthetic apparatus. *Voda: himija i jekologija*. 2009; 6: 34–40 (in Russian).
8. Artyukhova V.I., Dmitrieva A.G., Filenko O.F., Chjao Iczun. The changing dynamics of the culture growth and cell size *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Breb. under the action of potassium dichromate. *Zhurn. Izvestija RAN. Serija Biologicheskaja*. 1997; 3: 280–286 (in Russian).
9. Prokhotckaya V.Ju., Ipatova V.I., Dmitrieva A.G., Filenko O.F. Assessment of the degree of adaptation laboratory population of *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Breb. to potassium dichromate. *Zhurn. Vestnik moskovskogo un-ta. Serija 16 Biologija*. 2003; 3: 37–42

(in Russian).

10. Nriagu J.O., ed. *Aquatic Toxicology*. New-York: John Wiley & Sons. Inc.; 1983.
11. Dallakjan G.A., Ageeva I.V., Bratkovskaja L.B. Influence of shungit on the functional activity of microalgae *Scenedesmus quadricauda*. *Voda: himija i jekologija*. 2013; 10: 102–106 (in Russian).
12. Osipov E. V., Kalinin Ju.K., Reznikov V.A. The method of separation of fullerenes shungit. Patent RF, № 2270801; 2006 (in Russian).
13. Artyukhova V.I., Dmitrieva A.G., Filenko O.F., Chjao Iczun. Consequence of the potassium dichromate action on the culture of *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Breb. under changing toxic load. *Zhurn. Izvestija RAN. Serija Biologicheskaja*. 1997; 4: 440–445 (in Russian).

G.A.Dallakyan, S.I. Pogosyan, V.I. Ipatova, I.V. Ageeva

### INACTIVATION OF POTASSIUM DICHROMATE TOXIC ACTION ON THE GROWTH OF MICROALGAE USING SHUNGITE

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

The shungite effect on the culture of green chlorococcal microalga *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Breb was studied based on the amount of 100 g / l potassium dichromate at a concentration of 3 mg / l. In the presence of shungite, the culture growth stimulation was observed, and in the presence of potassium dichromate the growth inhibition occurred compared to the control. It is shown that the combined action of potassium dichromate and shungite on the *Scenedesmus quadricauda* population eliminates toxic effect of potassium dichromate. The most rapid growth of the culture occurred when only shungite was added to the culture medium, while the photosynthesis efficiency, number of cells and proportion of living cells increased in the presence of shungite. Apparently, shungite in the culture medium acts, on one hand, as sorbent, and on the other alters the redox state of the medium. The mechanism of action of shungite is nonspecific and can be used as a universal remedy for water purification from various pollutants.

**Key words:** *Scenedesmus quadricauda*, potassium dichromate, shungite cell viability, fluorescence, photosynthetic efficiency.

Материал поступил в редакцию 25.06.2014 г.

# «СЪЕЗДЫ И КОНФЕРЕНЦИИ»



## ШЕСТОЕ СОВМЕСТНОЕ ЗАСЕДАНИЕ ПО ОЦЕНКЕ ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ (СОСАМ-6) ОРГАНИЗАЦИИ ЭКОНОМИЧЕСКОГО СОТРУДНИЧЕСТВА И РАЗВИТИЯ

30 сентября – 3 октября 2014 года в г. Париже состоялось Шестое совместное заседание по оценке химических веществ (СоСАМ-6) Организации экономического сотрудничества и развития (ОЭСР). В заседании Комитета принимали участие представители государств-членов ОЭСР, государств и международных организаций-наблюдателей.

От Российской стороны в заседании приняли участие представители Роспотребнадзора. О.Ю. Мухина (Управление организации деятельности системы государственного санитарно-эпидемиологического надзора), Х.Х. Хамидулина (ФБУЗ «Российский регистр потенциально опасных химических и биологических веществ» Роспотребнадзора).

Программа СоСАМ разработана в целях методологии и способов оценки опасности веществ и классов веществ, которые нуждаются в совместной оценке и классификации опасности. Актуальными являются вопросы, связанные с классификацией химических веществ в соответствии с Согласованной на глобальном уровне системой классификации и маркировки химических веществ и смесей (СГС), а также с подходами по объединению химических веществ, близких по структуре и физико-химическим параметрам в группы для оценки их опасности и экстраполяции токсических свойств на мало изученные вещества в составе группы.

На заседании по утвержденной повестке были обсуждены проекты сводной информации о токсичности и опасности таких химических веществ, как 1,2-дихлор-4(хлорметил)бензол, 1-нафто-4-сульфоновой кислоты, натриевая соль, гексахлорэтан, гексаметилдисилоксан, титан диоксид, трибутиламин, флюоросиликон тример, t-бутилпероксибензоат, 2-(2-диметиламино) этоксизанол, алифатические кислоты, этилгидрогенадипат, аммоний карбонат, триметилсиланол, аммоний карбонат, растворимые соли кобальта, метил- и этилциклогексан, глицериды, медь и ее соединения, алкилпероксиэферы. Большая часть из перечисленных веществ прошли государственную регистрацию и расширенные сведения об их токсичности и опасности имеются в базе данных ФБУЗ «Регистр потенциально опасных химических и биологических веществ» Роспотребнадзора.

Доклады о токсичности и опасности химических веществ, представленные разными странами и сообществами, в частности Нидерландами, Корей, Японией, Консультативным комитетом по бизнесу и промышленности (ВИАС), Международным советом химических ассоциаций (ИССА), согласованы, внесены редакторские правки, после чего принято решение об их одобрении и распространении для использования при регулировании оборота химических веществ на мировом уровне.

Особую обеспокоенность вызвал доклад об опасности диоксида титана, представленный Кореей в сотрудничестве с ВИАС.

Диоксид титана широко используется в лакокрасочной и целлюлозно-бумажной, пищевой, парфюмерно-косметической и фармацевтической промышленности.

Данные, собранные, проанализированные и дополненные представителями Кореи, свидетельствуют о высокой степени вероятности канцерогенной активности данного вещества, что в свою очередь ставит под сомнение безопасность его использования в вышеперечисленных областях. Информация о канцерогенности диоксида титана вызвала бурное обсуждение среди представителей всех стран. Вынесено совместное решение о продолжении работы по сбору информации по данному веществу и возможности дополнительных консультаций с Международным агентством по изучению рака, которое титан диоксид относит к группе 2Б (возможно канцерогенный для человека).

Повторное рассмотрение информации по диоксиду титана перенесено на обсуждение в рамках проведения следующего заседания СоСАМ.

Рассмотренные вопросы представляют интерес для развития отечественной токсикологии и приобретения опыта участия в совместных международных исследованиях.

Вторая часть заседания была посвящена продолжению работы классификации опасности винилхлорида, предложенного в качестве экспериментального вещества для проведения классификации на предыдущем заседании СоСАМ. Для достижения согласованной позиции стран участников тренинга по таким показателям, как острая токсичность (пероральная, кожная, ингаляционная), раздражение кожи, глаз, сенсибилизация респираторная и кожная, мутагенность, репродуктивная токсичность, канцерогенность, токсичность органов-мишеней (однократное и повторяющееся воздействие) были предложены расширенные (дополнительные) данные.

От Российской стороны в тренинге принимали участие специалисты Всероссийского научно-исследовательского центра стандартизации, информации и сертификации сырья, материалов и веществ (ВНИЦСМВ).

Согласованная позиция была достигнута в отношении категорий классификации по семи из девяти конечных точек. Однако разногласия так и не были урегулированы в отношении токсичности органов-мишеней (однократное и повторяющееся воздействие).

В ходе обсуждения результатов выявлен ряд причин расхождения данных. В условиях ограниченности данных о влиянии вещества на организмы, страны проявили различный подход к выбору аналогового вещества, а также к интерпретации информации для оценки опасности и классификации. Наиболее неожиданным стало обнаружение некоторой двусмысленности в интерпретации критериев СГС.

Проведение подобных тренингов позволяет повысить уровень взаимопонимания экспертов и специалистов разных стран.

Особый интерес вызвало предложение создания глобального списка классифицированных веществ. Однако, по мнению специалистов стран-участников заседания, создание такого списка будет сопровождаться рядом сложностей, таких как конфиденциальность некоторых данных

внутри стран, а также методов выбора приоритетных веществ.

По мнению большинства участников рабочей группы, необходимо обратить более пристальное внимание на разработку новых методов оценки опасности химических веществ, например, для тестирования и прогнозирования свойств химических веществ, а также на пересмотр и доработку существующих методов и рекомендаций по оценке опасности. Необходимо отметить, что данные, полученные не в соответствии с методами и рекомендациями ОЭСР, не представляют научного и практического интереса при их использовании в странах-членах ОЭСР. В связи с чем внедрение методов тестирования ОЭСР в практику исследований профилактической токсикологии носит приоритетный характер.

Следующее заседание CoSAM-6 запланировано на октябрь 2015 года.

***Х.Х. Хамидулина***

# ЮБИЛЕЙНЫЕ ДАТЫ

## ЛУЖНИКОВ ЕВГЕНИЙ АЛЕКСЕЕВИЧ

(к 80-летию со дня рождения)

27 сентября 2014 года исполнилось 80 лет академику РАМН, профессору, заслуженному деятелю науки РФ, руководителю научного отделения лечения острых отравлений НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского, заведующему кафедрой клинической токсикологии Российской медицинской академии последипломного образования Евгению Алексеевичу Лужникову.

После окончания в 1960 г. 2-го МОЛГМИ им. Н.И. Пирогова он работал врачом скорой медицинской помощи, младшим научным сотрудником терапевтической клиники НИИ СП им. Н.В. Склифосовского, доцентом кафедры госпитальной терапии 1-го ММИ им. И.М. Сеченова, в 1967 г. – заведующим Московским городским центром лечения отравлений. С 1972 г. он руководитель научного отделения лечения острых отравлений НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского. Академик Е.А. Лужников является одним из организаторов специализированной токсикологической клинической службы в нашей стране, в составе которой действуют более 40 центров (отделений) лечения острых отравлений в наиболее крупных городах России.

В 1986 г. по инициативе Е.А. Лужникова создана первая в стране кафедра клинической токсикологии Российской медицинской академии последипломного образования, которая подготовила тысячи специалистов-токсикологов, работающих по всей стране и за рубежом. Под научным руководством Евгения Алексеевича выполнено 25 докторских и 48 кандидатских диссертаций.

Результаты научных исследований Е.А. Лужникова нашли отражение в более чем 600 работах, в том числе 32 монографиях и книгах. Среди них: «Основы реаниматологии при острых отравлениях» (1977), «Клиническая токсикология» (1982, 1994, 1999), а также «Медицинская токсикология. Национальное руководство» (2012), в котором обобщены теоретические и практические вопросы этой дисциплины. Имеет 34 авторских свидетельства и патента на изобретение.



В 1979 г. за разработку и внедрение в практику метода гемосорбции Е.А. Лужникову присуждена Государственная премия СССР. Имеет правительственные награды: орден Дружбы народов (1997) и «За заслуги перед отечественным здравоохранением» (2003).

Много внимания Е.А. Лужников уделяет научной общественной деятельности. Он является председателем проблемной комиссии «Острые отравления» межведомственного научного совета РАН по проблемам скорой медицинской помощи, членом редколлегии журналов «Анестезиология и реаниматология» и «Токсикологический вестник», президентом Ассоциации клинических токсикологов, членом правления Всероссийской общественной организации токсикологов, Российской ассоциации анестезиологов и реаниматологов, Международной Ассоциации специалистов по эфферентной терапии, Европейской ассоциации центров лечения отравлений и клинических токсикологов.

Поздравляем глубокоуважаемого Евгения Алексеевича со знаменательной датой, желаем ему крепкого здоровья, успешной дальнейшей научной и педагогической деятельности.

**ГБУЗ НИИ скорой помощи  
им. Н.В. Склифосовского ДЗ г. Москвы  
ФГБУ «Научно-практический  
токсикологический центр» ФМБА России  
ГБОУ ДПО «Российская медицинская  
академия последипломного образования»  
Межрегиональная общественная  
организация «Ассоциация клинических  
токсикологов»  
Правление Всероссийской общественной  
организации токсикологов  
Редколлегия журнала «Токсикологический  
вестник»**

# БЮЛЛЕТЕНЬ



Российского регистра потенциально опасных химических и биологических веществ

## НОВЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТОКСИКОЛОГИИ И СМЕЖНЫМ ДИСЦИПЛИНАМ

• **Токсикологическая химия: учебное пособие.** Ч. 1. Токсические вещества, изолируемые из биологического материала методом перегонки с водяным паром / *А.Н. Гребенюк, В.Н. Ку克林, О.Ю. Стрелова, Е.Н. Степанова, Т.С. Самоукова.* – СПб.: Изд-во СПХФА, 2014. – 168 с.

Учебное пособие подготовлено в соответствии с учебной программой и тематическим планом изучения дисциплины «Токсикологическая химия» для студентов, обучающихся по специальности «Фармация». В пособии представлена общая характеристика веществ, изолируемых из биологического материала методами дистилляции: синильная кислота и ее производные, хлорированные и фторированные углеводороды, спирты, альдегиды и кетоны, фенол и крезолы, бензины, керосины, бытовой газ, тетраэтилсвинец. Описаны физико-химические свойства этих веществ, механизмы их токсического действия, основные клинические формы интоксикации, мероприятия первой помощи и основные принципы лечения поражений. Представлены общие и частные методы изолирования «летучих ядов» из биологических материалов и их анализ на основе химического и газохроматографического методов. В пособии описаны методики проведения практических занятий, реактивы, приборы и оборудование для выполнения лабораторных работ, представлены вопросы для самоподготовки, тестовые задания, ситуационные задачи, основная и дополнительная литература. Пособие предназначено для студентов фармацевтических вузов и факультетов, но может быть использовано и в практической деятельности специалистов судебно-химических, токсикологических и химико-аналитических лабораторий, а также провизоров и токсикологов.

• *Архангельский В.И., Кириллов В.Ф.*

### Гигиена и экология человека

Учебник для медицинских училищ и колледжей  
Изд. группа «Гэотар-Медиа», М., 2014 - 176 с.

• *Ланин Д.В.*

**Научные основы гигиенической оценки воздействия химических факторов окружающей и производственной среды на состояние процессов иммунной и нейроэндокринной регуляции**

Автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора медицинских наук (14.02.01 - Гигиена 14.03.09 - Клиническая иммунология, аллергология (медицинские науки)), Пермь. 2014.- 50 с.

• *Шабанов П.Д.*

### Наркология. Руководство.

Изд. группа «Гэотар-Медиа», М., 2015.- 832 с.

• **Green Growth Indicators 2014**

OECD, 2014.-144 p.

Доклад ОЭСР «Green Growth Indicators 2014» ищет ответы на следующие ключевые вопросы: Как эффективно и экологично использовать экономические ресурсы? Какие меры по сохранению окружающей среды улучшают качество жизни каждого человека в отдельности? Создают ли «зеленая экономика» и «зеленый рост» новые экономические возможности, и какие политические шаги являются подходящими для повышения экономического потенциала зеленых технологий?

• **The Cost of Air Pollution**

### Health Impacts of Road Transport

OECD, 2014.-80 p.

В новом докладе ОЭСР приведены статистические данные о загрязнении воздуха по различным регионам, а также политические рекомендации по решению этой проблемы. Авторы доклада отмечают, что правительства стран должны поддерживать тесные режимы регулирования и высокие стандарты производства и эксплуатации автомобильного транспорта. Кроме того, необходимо пересмотреть транспортную налоговую политику, что способствовало бы переходу к дизельным автомобилям.