ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ ВЕСТНИК

Toxicological Review

Научно-практический журнал

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

№6 (135), **2015**

СОДЕРЖАНИЕ

УДК 61.616-06.615.9:099-07.08

НАРУШЕНИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КЛЕТОЧНОГО КОМПОНЕНТА ТОКСЕМИИ И ИХ КОРРЕКЦИЯ ПРИ ОСТРЫХ ОТРАВЛЕНИЯХ В РЕАБИЛИТАЦИОННОМ ПЕРИОДЕ

А. В. Бадалян[1,2], Н. В. Боровкова[1], Ю. С. Гольдфарб[1,2], Ю. В. Андреев[1], А. Н. Ельков[1]

[1]ГБУЗ «НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского ДЗМ», 129090, г. Москва, Российская Федерация
[2]ГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования» МЗ РФ, 123242, г. Москва, Российская Федерация

Обобщены наблюдения над 59 больными, поступившими в реабилитационное токсикологическое отделение НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского после тяжелых отравлений психофармакологическими средствами (13), прижигающими жидкостями (18) и нейротоксикантами (наркотики группы опия, этанол и психофармакологические средства) (28). У всех больных выявлены признаки эндотоксикоза средней степени тяжести: средние значения концентрации лейкоцитов в венозной крови несколько превышали пределы нормы, отмечено также увеличение концентрации в крови погибших клеток и содержания лимфоцитов, экспрессирующих на поверхности Fas-рецептор. Полученные данные использованы для оценки эффективности немедикаментозных методов лечения (лазерная гемотерапия, мезодиэнцефальная модуляция, гипербарическая оксигенация) и фармакотерапии (мексидол). Коррекция эндотоксикоза при включении в комплексную терапию упомянутых выше методов позволяет значительно сократить сроки реабилитации пациентов, что положительно отражается на длительности стационарного лечения.

Ключевые слова: *острые отравления, диагностика, лечение, эндотоксикоз, клеточный компонент токсемии.*

Введение. Реабилитация – это восстановление здоровья, функционального состояния и трудоспособности, нарушенных болезнями, травмами или физическими, химическими и социальными факторами [1].

Реабилитационный период при острых отравлениях (ОО) начинается после окончания общереанимационных и связанных с ними детоксикационных мероприятий, направленных на удаление из организма экзогенных токсикантов химической природы; при этом больные, как правило, находятся в реабилитационном токсикологическом отделении.

По нашим наблюдениям [2], резкое увеличение сроков лечения больных чаще всего связано с имеющимися на реабилитационном этапе осложнениями острых отравлений (ОО) [3]: пневмонией, неблагоприятным течением ожога желудочно-кишечного тракта, а также развитием энцефалопатии (ЭП) с сопутствующими ей психическими нарушениями. Указанные осложнения закономерно сопровождаются вы-

Бадалян Амаяк Вазгенович (Badalyan Amayak Vazgenovich), кандидат медицинских наук, заведующий отделением лечения острых отравлений Государственного бюджетного учреждения здравоохранения города Москвы «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения города Москвы», доцент кафедры клинической токсикологии Государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия последипломного образования», 129090, г. Москва, Российская Федерация, drbadalian@mail.ru
Боровкова Наталья Валерьевна (Borovkova Natalya Valeryevna), доктор медицинских наук, заведующая лабораторией трансплантации клеток и иммунотипирования Государственного бюджетного учреждения здравоохранения города Москвы «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения города Москвы», 129090, г. Москва, Российская Федерация, BorovkovaNV@yandex.ru
Гольдфарб Юрий Семенович (Goldfarb Yuriy Semenovich), доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделом внешних научных связей Государственного бюджетного учреждения здравоохранения города Москвы «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения города Москвы», профессор кафедры клинической токсикологии Государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия последипломного образования», 129090, г. Москва, Российская Федерация, goldfarb@mail.ru
Андреев Юлий Вадимович (Andreev Yuliy Vadimovich), кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории трансплантации клеток и иммунотипирования Государственного бюджетного учреждения здравоохранения города Москвы «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения города Москвы», 129090, г. Москва, Российская Федерация, yulii1982@yandex.ru
Ельков Александр Никонорович (Elkov Aleksandr Nikonorovich), кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник отделения лечения острых отравлений Государственного бюджетного учреждения здравоохранения города Москвы «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения города Москвы», 129090, г. Москва, Российская Федерация, katerbobik@mail.ru

раженными проявлениями эндотоксикоза, требующими коррекции, и приводят к резкому увеличению сроков госпитализации в среднем от 2,3 – 10,8 сут. при отсутствии осложнений и до 13,4 – 23,9 сут. в случаях их развития.

В реабилитационном токсикологическом отделении завершается клинический этап лечения соматических и психических осложнений, отрицательно влияющих на ход выздоровления. Для этого используется фармакологическая коррекция, а кроме того, с успехом применяются немедикаментозные методы лечения в виде физиогемотерапии (лазерной гемотерапии – ЛГТ), мезодиэнцефальной модуляции (МДМ) и гипербарической оксигенации (ГБО).

Для полноценного устранения эндотоксикоза при осложненном течении ОО необходима его диагностика и контроль результатов лечения с помощью соответствующих лабораторных показателей.

В последнее время большое внимание уделяется исследованию апоптоза иммунокомпетентных клеток [4,5,6]. В исследованиях, проведенных при разных патологических состояниях, выявлена зависимость уровня апоптоза лимфоцитов периферической крови от степени тяжести эндотоксикоза. Отмечена возможность использования показателей концентрации апоптотических лимфоцитов для прогноза течения заболевания и оценки эффективности методов коррекции эндогенной интоксикации. В то же время данные о концентрациях в крови погибших и апоптотических клеток при наиболее часто встречающихся ОО отсутствуют.

Целью исследования явилось изучение апоптоза лимфоцитов в крови пациентов в реабилитационном периоде ОО и оптимизация коррекции нарушенных показателей в процессе комплексного лечения.

Материал и методы исследования. Исследования проводили у 59 больных, с осложненным течением ОО, переведенных в реабилитационное токсикологическое отделение из отделения реанимации и интенсивной терапии Центра лечения острых отравлений НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского: из них у 13 имели место отравления психофармакологическими средствами (оПФС), у 18 – прижигающими жидкостями (оПЖ), а у 28 – нейротоксикантами (оНТ) (наркотики группы опия – 11, этанол – 7, психофармакологические средства – 10). Течение заболевания при оПФС осложнилось патологическими процессами в легких: пневмонией (9 случаев) и гиповентиляцией (4). При оПЖ с химическим ожогом слизистой пищевода и желудка 3–4 ст. заболевание осложнилось постожоговыми язвами или рубцовыми деформациями пищевода и желудка. Течение оНТ сопровождалось ЭП. По выраженности изменений клинико-лабораторных показателей, наблюдаемых при госпитализации, все больные были отнесены нами к тяжелым.

Группы сравнения составили 29 больных с аналогичным составом отравлений (оПФС – 8, оПЖ – 11, оНТ – 10), которые получали только консервативную (базовую) терапию.

Из фармакологических препаратов во всех группах больных нами применялся 5% раствор мексидола (М) при внутривенном введении в дозе 4 мл/сут. в течение 5–10 дней.

При оПФС для предупреждения и лечения пневмонии кроме медикаментозной коррекции с помощью М нами использовалась его комбинация с внутривенной ЛГТ (5–10 процедур ежедневно), проводимой аппаратом «АЗОР-ВЛОК» (мощность 1,5 мВт, длительность процедуры – 1 или 1,5 ч, расходуемая энергия излучения 5,4 и 8,1 Дж соответственно), разработанного ТОО «АЗОР» (лицензия ЦЛМД № 6237/6233), г. Москва.

В процессе лечения постожоговых язв слизистой пищевода и желудка также применяли введение М и его комбинацию с ГБО. Сеансы ГБО проводили в отделении гипербарической оксигенации НИИ СП им. Н.В. Склифосовского (заведующая – д.м.н. М.В. Ромасенко). Процедуры выполнялись ежедневно при давлении 0,4 и 0,6 избыточных атмосфер в течение 40 мин. курсами по 10 сеансов у каждого больного в одноместных барокамерах ОКА-МТ и БЛКС.

Для лечения ЭП использовали мексидол и его комбинацию с МДМ, либо с ГБО и МДМ одновременно. МДМ-терапия проводилась с помощью отечественного аппарата серийного производства «МДМ-101». Электроды располагали контактно по лобно-затылочной методике, отрицательный электрод – на затылке. Частота следования импульсов была 80±1 Гц. Процедуры МДМ проводили ежедневно в течение 4–5 дней. Длительность одной процедуры составляла 20 минут. Сила тока колебалась в пределах 0,1–6 мА и регулировалась по субъективным ощущениям.

Показатели апоптоза определяли в венозной крови до начала лечения и перед выпиской. Референтную группу составили 40 доноров крови в возрасте от 20 до 45 лет.

Исследование апоптоза лимфоцитов и подсчет погибших лейкоцитов проводили с помощью проточной цитометрии. Количество лимфоцитов, готовых вступить в апоптоз, оценивали по экспрессии Fas-рецептора с помощью моноклональных антител CD95 и выражали в процентах по отношению к популяции лимфоцитов [7, 8]. Относительное количество лимфоцитов венозной крови в процессе апоптоза определяли с помощью Annexin V-FITC/7AAD Kit. Од-

новременное окрашивание клеток витальным ДНК-специфичным красителем 7-амино-актиномицина D (7AAD) позволяло дифференцировать клетки на ранних стадиях апоптоза (Annexin V+/ 7AAD–, ранний апоптоз) от клеток, уже погибших в результате апоптоза (Annexin V+/ 7AAD+, поздний апоптоз) [7, 9]. Определение числа погибших лейкоцитов осуществляли с помощью витального красителя 7AAD [10] и моноклональных антител CD45 (панлейкоцитарный маркер), меченных FITC [11], и выражали в количестве клеток в литре и в процентах.

Полученные данные обрабатывали методом вариационной статистики с использованием критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Результаты обследования пациентов при поступлении в отделение реабилитации представлены в таблице 1. Как видно из таблицы, средние значения концентрации лейкоцитов в венозной крови пациентов обследованных групп несколько превышали пределы нормы. При этом у пациентов с оПЖ концентрация лейкоцитов в венозной крови была статистически значимо выше, чем у пациентов с оНТ. Также у пациентов всех трех групп отмечено увеличение концентрации в крови погибших клеток и содержания лимфоцитов, экспрессирующих на поверхности Fas-рецептор. Отметим, что у больных с оПФС концентрация в венозной крови CD95+ лимфоцитов в свою очередь была статистически значимо выше, чем у пациентов с оПЖ. Количество лимфоцитов в раннем апоптозе у обследованных пациентов всех трех групп превышало значения нормы в 2,4–3 раза.

Таким образом, в реабилитационном периоде после тяжелого ОО различными препаратами определялись признаки эндотоксикоза средней степени тяжести, для которого наиболее характерным критерием является повышенная концентрация в венозной крови погибших лейкоцитов [12], что наблюдалось и по нашим данным. При этом наиболее выраженные проявления эндотоксикоза наблюдались при оПЖ, а в наименьшей мере – при оНТ. Отмечалось повышение концентрации лимфоцитов, экспрессирующих на своей поверхности рецептор смерти (Fas-рецептор), и клеток в процессе апоптотической гибели, чаще всего встречающиеся при развитии пневмонии. Это могло быть обусловлено активационными процессами в иммунной системе в ответ на действие токсиканта и/или повреждение собственных клеток и тканей [12]. Воспалительные осложнения, такие как пневмония или язвы и рубцовые деформации слизистой пищевода и желудка, кроме того, сопровождались развитием лейкоцитоза.

В целом, однако, следует отметить, отсутствие статистически значимой разницы между аналогичными показателями в группах больных, что свидетельствует об однотипности наблюдаемых изменений клеточного компонента токсемии независимо от особенностей патологического процесса при различных отравлениях.

Таблица 1

Показатели апоптоза лимфоцитов в крови пациентов в реабилитационном периоде острых отравлений

Показатели	Норма	До лечения		
		оНТ	оПФС	оПЖ
Количество лейкоцитов в венозной крови ($\times 10^9$/л)	6,4±0,3	9,4±0,6*	9,7±0,6*	11,6±0,7*
CD95+ лимфоциты, % (Fas-рецептор)	44,5±1,0	71,6±4,4*	76,6±3,5*	65,0±3,9*
Количество лимфоцитов в раннем апоптозе, %	2,74±0,23	7,0±0,9*	6,6±0,7*	8,5±1,0*
Количество лимфоцитов в позднем апоптозе, %	0,10±0,02	0,22±0,05	0,25±0,07*	0,20±0,05
Относительное количество погибших лейкоцитов, %	0,65±0,09	1,69±0,44*	1,60±0,2*	1,49±0,19*
Содержание погибших лейкоцитов ($\times 10^9$/л)	0,041±0,006	0,139±0,019	0,148±0,009*	0,180±0,026*

Примечание: * – статистически значимое ($p<0.05$) отличие от нормы

Таблица 2

Показатели апоптоза лимфоцитов крови у больных с острыми отравлениями на фоне базовой терапии в реабилитационном периоде

Показатели	Норма (n=30)	Группы больных								
		оНТ (n=10)			оПФС (n=8)			оПЖ (n=11)		
		До лечения	После лечения	Δ%	До лечения	После лечения	Δ%	До лечения	После лечения	Δ%
Количество лейкоцитов в венозной крови (×10^9/л)	6,4± 0,3	8,1± 0,6	8,7±1,1	7,4	10,0±0,7	10,5± 1,2	5,0	11,9±1,3	9,6± 0,4	-19,3
CD95+ лимфоциты, % (Fas-рецептор)	44,5± 1,0	85,4± 2,4	78,4±4,8	-11,6	86,0±1,7	66,6± 2,5*	-22,6	68,9±6,0	77,2± 0,1	12,0
Количество лимфоцитов в раннем апоптозе, %	2,74± 0,23	9,55± 1,44	10,08±1,20	25,0	6,75±1,22	10,35± 3,73	53,3	10,80±1,89	8,34± 0,75	-23,1
Количество лимфоцитов в позднем апоптозе, %	0,10± 0,02	0,21± 0,04	0,17± 0,03	50,0	0,15± 0,02	0,36± 0,13	140	0,17±0,02	0,15± 0,04	0,0
Относительное количество погибших лейкоцитов (%)	0,65± 0,09	1,68±0,25	1,12±0,20*	-35,3	1,55± 0,36	1,30± 0,22	-16,1	1,16±0,22	0,97± 0,12	-16,7
Содержание погибших лейкоцитов (×10^9/л)	0,041±0,006	0,122±0,023	0,095±0,025	-32,0	0,144±0,030	0,125± 0,027	-25,4	0,144±0,034	0,092±0,011	-36,1

Примечание: * – статистически значимое отличие от исходного показателя (p<0,05 по Стьюденту)

Изменения показателей клеточного компонента токсемии на фоне базовой терапии представлены в таблице 2. Как видно из таблицы, в крови пациентов групп сравнения сохранялось умеренное увеличение количества лейкоцитов (от 8,7±1,1 у больных с оНТ до 10,5±1,2 при оПФС). Содержание активированных лимфоцитов, экспрессирующих Fas-рецептор, а также количество клеток на разных стадиях апоптоза оставалось повышенным (в среднем на 40%). Отмечалась тенденция к снижению содержания погибших лейкоцитов в венозной крови. У большинства пациентов как относительное, так и абсолютное содержание клеток, окрашенных 7AAD, регистрировалось в пределах нормы и только в 18% случаев сохранялось умеренное повышение числа погибших клеток в 1,5–2,5 раза (от 0,106 до 0,200 ×10^9/л), что соответствовало средней степени эндогенной интоксикации.

Как видно, на фоне базовой терапии у пациентов группы сравнения сохранялась активация клеток иммунной системы, что сопровождалось повышенным (в 4–5 раз) апоптозом лимфоцитов венозной крови. При этом степень тяжести эндогенной интоксикации снижалась, постепенно восстановился физиологический уровень погибших клеток в венозной крови.

Включение М в базовую терапию сопровождалось статистически значимым снижением содержания лейкоцитов венозной крови у пациентов с оНТ и оПФС (рис. 1) и абсолютной концентрации погибших клеток в венозной крови у пациентов всех трех обследуемых групп, что свидетельствовало об уменьшении степени тяжести эндогенной интоксикации.

У пациентов с оНТ и оПФС отмечалась тенденция к нормализации показателей, отражающих готовность лимфоцитов к апоптозу, а также концентрации лимфоцитов, уже погибших в резуль-

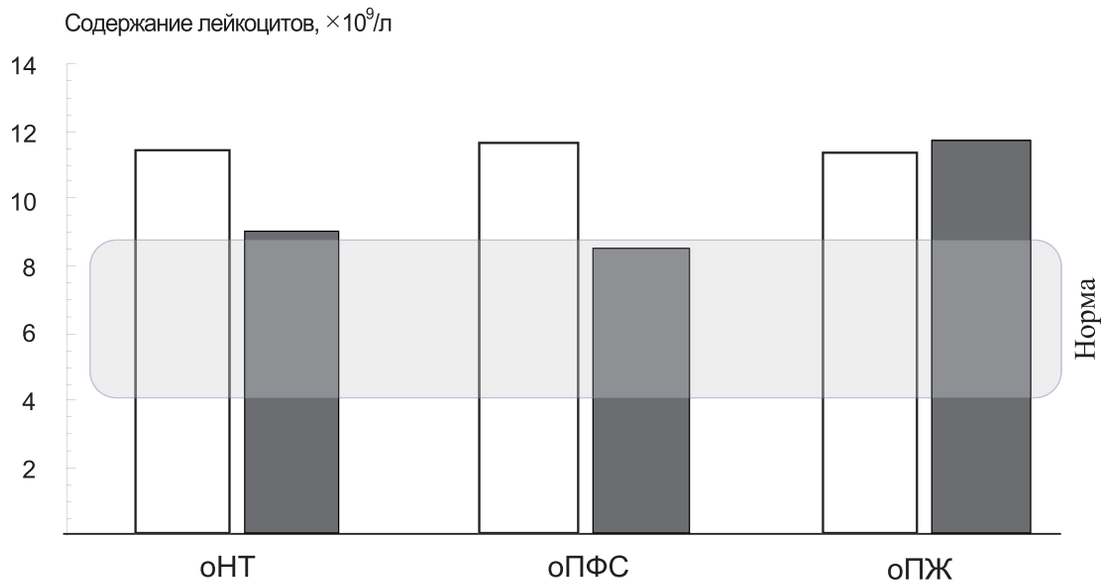


Рис. 1. Динамика содержания лейкоцитов в венозной крови на фоне применения М в реабилитационном периоде острых отравлений

Условные обозначения: □ – до лечения; ■ – после лечения

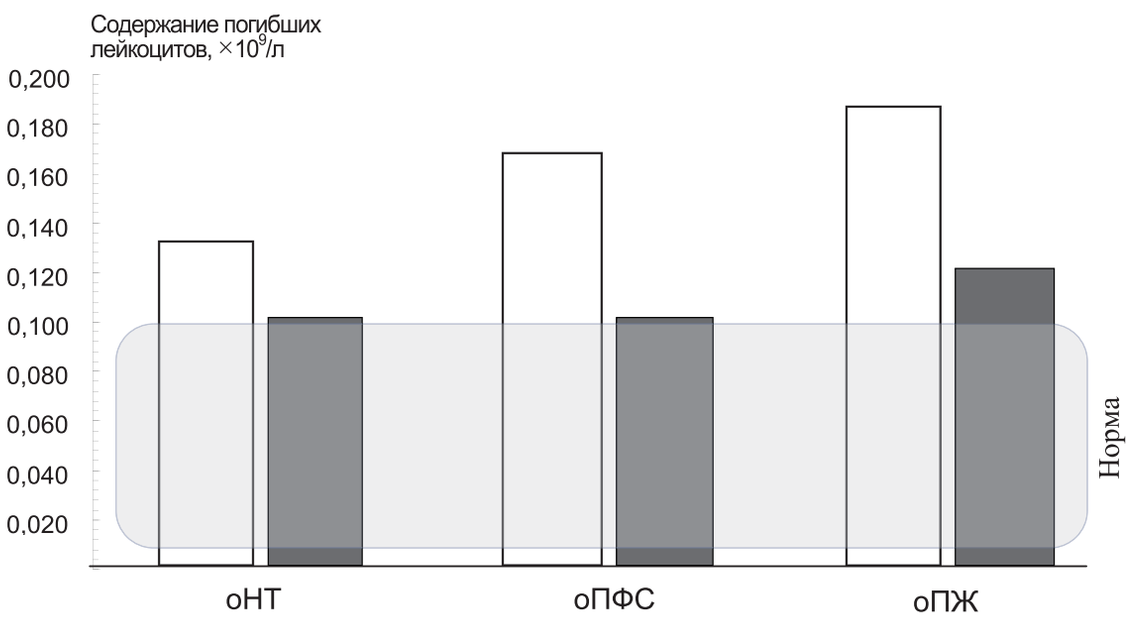


Рис. 2. Динамика содержания погибших лейкоцитов в венозной крови на фоне применения М

Условные обозначения: □ – до лечения; ■ – после лечения

тате апоптоза (рис. 2). В то же время у пациентов с оПЖ как общее содержание лейкоцитов, так и содержание погибших лейкоцитов и показатели апоптоза лимфоцитов на фоне лечения М существенно не менялись, что свидетельствовало о сохранении воспалительного процесса.

У пациентов с оНТ использование комбинации М с МДМ не сопровождалось значимыми изменениями показателей апоптоза лимфоцитов венозной крови. Отмечено статистически значимое увеличение относительного содержания погибших лейкоцитов: эндогенная интоксикация в этой группе больных сохранялась на исходном уровне (рис. 3). Как видно из того же рисунка,

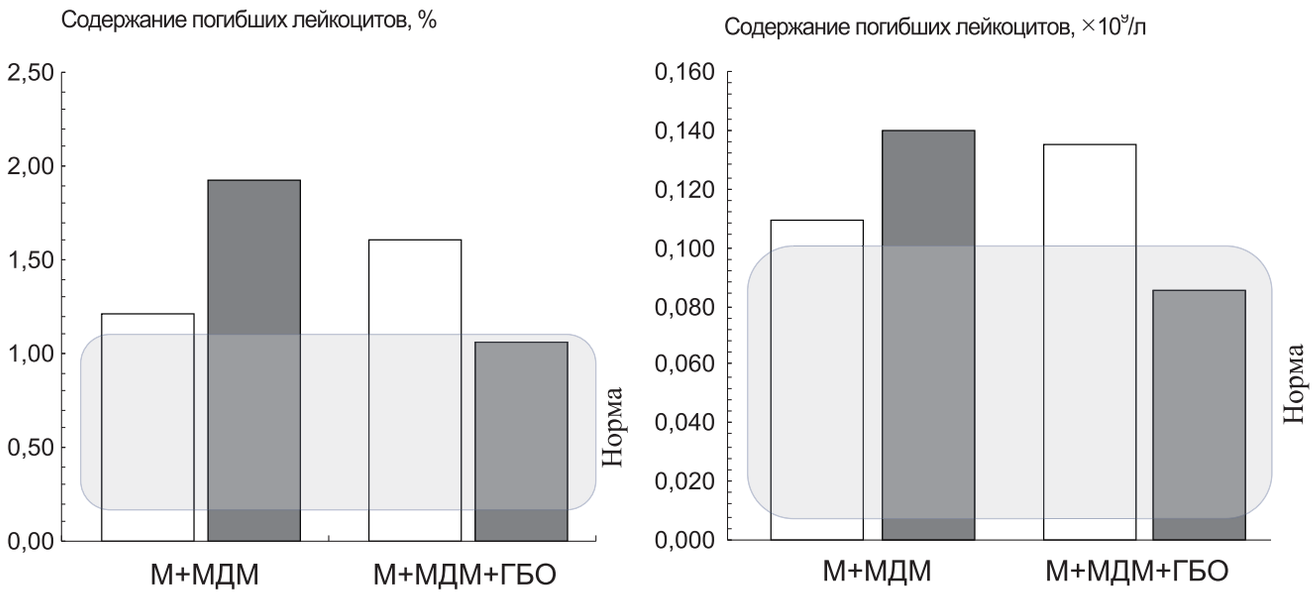


Рис. 3. Динамика содержания погибших лейкоцитов в венозной крови при тяжелых оНТ на фоне комбинированного лечения в реабилитационном периоде

Условные обозначения: □ – до лечения; ■ – после лечения

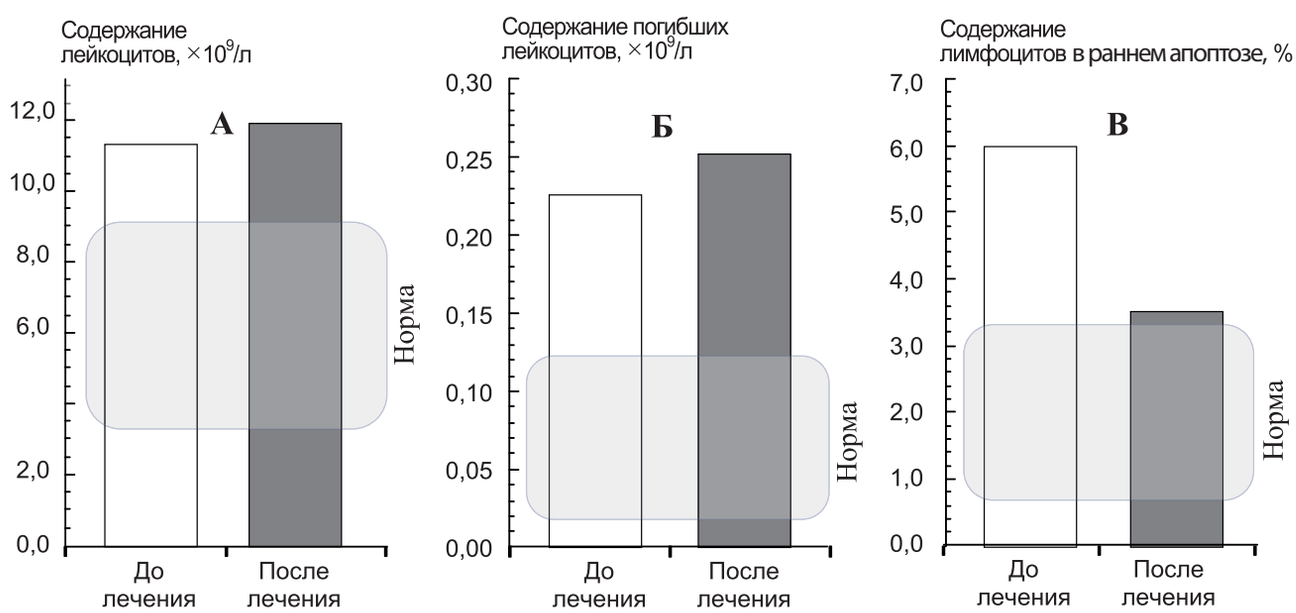


Рис. 4. Динамика содержания лейкоцитов (А), погибших лейкоцитов (Б) и лимфоцитов в раннем апоптозе (В) в венозной крови на фоне комбинированного лечения М и ГБО в реабилитационном периоде при тяжелых оПЖ

Условные обозначения: □ – до лечения; ■ – после лечения

Таблица 3

Клиническая эффективность комплексного лечения тяжелых отравлений на этапе реабилитации

Группы больных:	Сроки лечения (сутки), группы больных:		Δ%
	Контрольная	Основная	
оПФС	29,9±5,9	16,3±1,6*	–45,5
оНТ	17,3±2,9	14,5±0,9	–16,2
оПЖ	34,1±3,6	26,4±2,0	–22,6

Примечание: * – $p < 0,05$

у пациентов, получавших одновременно сеансы ГБО, МДМ и введение М, отмечены нормализация содержания погибших клеток в венозной крови и тенденция к нормализации числа CD95+ лимфоцитов. При этом концентрация лимфоцитов на ранних стадиях апоптоза повышалась в среднем на 35% по сравнению с исходным уровнем. Возможно, такие изменения исследуемых показателей связаны с разрешением воспалительной реакции и необходимостью элиминации реактивных клонов лимфоцитов.

Комбинированное применение М с ЛГТ у пациентов с оПФС, осложненных пневмонией, также сопровождалось нормализацией содержания лейкоцитов, однако как относительное, так и абсолютное количество погибших клеток в венозной крови сохранялось повышенным, соответствующим средней степени тяжести эндогенной интоксикации. Также отмечена тенденция к усилению апоптоза лимфоцитов.

Комбинированное использование М с ГБО в комплексе лечения при оПЖ в реабилитационном периоде не вызывало существенных изменений большей части исследуемых параметров. У этих пациентов сохранялись умеренный лейкоцитоз и повышенное содержание погибших клеток в венозной крови, характерное для средней степени тяжести эндогенной интоксикации (рис. 4). В то же время после лечения содержание лимфоцитов на ранних стадиях апоптоза регистрировалось в пределах верхних границ физиологической нормы, что при наличии клинических и инструментальных данных, свидетельствующих о благоприятном течении заболевания, требует дальнейшего лабораторного контроля на амбулаторном этапе.

Как видно из таблицы 3, проводимое лечение сопровождается заметным снижением сроков госпитализации больных – в 1,2 – 1,8 раза, наибольшим при оПФС.

Таким образом, в реабилитационном периоде при обследовании больных всех выделенных групп с использованием цитометрических методов определения апоптоза лейкоцитов периферической крови обнаруживаются признаки эндотоксикоза средней степени тяжести, о чем преимущественно свидетельствуют заметное (в 1,5–2,5 раза) повышение содержания в крови погибших лейкоцитов и значительное возрастание (в 4–5 раз) концентрации лимфоцитов в раннем апоптозе. Это соответствует полученным нами ранее данным с использованием биохимических показателей эндотоксикоза [13].

В отношении лечебных мероприятий следует отметить, что по оцениваемым параметрам среди использованных методов наиболее эффективным оказалось введение М у пациентов с оПФС и оПЖ. При оНТ с развитием ЭП наилучшие результаты наблюдались при комбинации М с ГБО и МДМ.

Следует при этом отметить, что, несмотря на то, что коррекция эндотоксикоза с помощью использованных подходов к лечению не во всех случаях оказывается достаточно успешной, клинические данные, тем не менее, указывают на явную положительную тенденцию в плане ускорения выздоровления во всех группах обследованных больных. Это говорит о необходимости дальнейшего усовершенствования применяемых методов лечения, а также делает актуальным продолжение изучения других присущих им лечебных механизмов.

Заключение. В соответствии с полученными результатами можно констатировать, что коррекция эндотоксикоза с помощью включения в комплексную терапию упомянутых выше методов позволяет значительно сократить сроки реабилитации пациентов, что положительно отражается на длительности стационарного лечения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Физическая реабилитация / под ред. С.Н. Попова. – 3-е изд., перераб. и доп. Ростов-на-Дону; М.: Феникс; 2005. – (Высшее образование).
2. *Бадалян А. В., Гольдфарб Ю. С., Лужников Е. А.* и др. Проблема реабилитации при острых отравлениях химической этиологии // Анестезиол. и реаниматол. 2008; 6: 39–41.
3. *Бадалян А. В.* Реабилитация больных // Медицинская токсикология: нац. рук-во / под ред. Е.А. Лужникова. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2012. – (Сер.: Национальные руководства). 15 (15.1.): 809–817.
4. *Боровкова Н. В., Хватов В. Б., Александрова И. В.* и др. Апоптоз мононуклеаров и содержание погибших лейкоцитов в венозной крови больных с сепсисом // Вестник РАМН. 2009; 8: 33–36.
5. *Боровкова Н. В., Александрова И. В., Валетова В. В.* и др. Апоптоз лимфоцитов крови в норме и при патологии // Молекулярная медицина. 2013; 4: 41–45.
6. *Боровкова Н. В.* Особенности исследования апоптоза лимфоцитов у хирургических больных // Совр. лаборатория. 2014; 1: 52–55. – (Медицинский алфавит).
7. *Susin S.A., Zamzami N., Castedo M.* et al. The central executioner of apoptosis: multiple connections between protease activation and mitochondria in Fas / APO-1/CD95 – and ceramide-induced apoptosis // J. Exp. Med. 1997; 186 (1): 25–37.
8. *Itoh N., Yonehara S., Ishii A.* et al. The polypeptide encoded by the cDNA for human surface antigen FAS can mediate apoptosis // Cell. 1991; 66 (2): 233–243.
9. *Lecoeur H., Ledru E., Prévost M.C., Gougeon M.L.* Strategies for phenotyping apoptotic peripheral human lymphocytes comparing ISNT, annexin-V and 7-AAD cytofluorometric staining methods // J. Immunol. Method. 1997; 209 (2): 111–123.
10. *Zelenin A.V., Poletaev A.I., Stepanova N.G.* et al. 7-Amino-actinomycin D as a specific fluorophore for DNA content analysis by laser flow cytometry // Cytometry. 1984; 5 (4): 348–354.
11. *Morse E.E., Yamase H.T., Greenberg B.R.* et al. The role of cytometry in the diagnosis of lymphoma: a critical analysis // Ann. Clin. Lab. Sci. 1994; 24 (1): 6–11.
12. *Чередеев А. Н., Ковальчук Л. В.* Апоптоз как важный этап оценки иммунной системы по патогенетическому принципу // Клин. лабор. диагностика. 1997; 7: 31–35.
13. *Бадалян А. В., Лужников Е. А., Гольдфарб Ю. С.* и др. Изменения показателей гомеостаза в реабилитационном периоде при острых отравлениях химической этиологии // Анестезиол. и реаниматол. 2013; 3: 43–50.

REFERENCES:

1. *Popov S.N.,* ed. Fizicheskaya reabilitatsiya. [Physical rehabilitation]. 3rd ed., rev. and add. Rostov-na-Donu, Moscow: Feniks Publ., 2005; 608 p. – (Vysshee obrazovanie). (In Russian).
2. *Badalyan A.V.,* Gol'dfarb Yu.S., Luzhnikov E.A., et al. Problema reabilitatsii pri ostrykh otravleniyakh khimicheskoy etiologii [The problem of rehabilitation in acute poisoning of chemical etiology]. Anesteziologiya i reanimatologiya. 2008; 6: 39–41. (In Russian).
3. *Badalyan A.V.* Reabilitatsiya bol'nykh [Rehabilitation of patients.]. In: E.A. Luzhnikov, ed. Meditsinskaya toksikologiya [Medical toxicology]. Moscow: GEOTAR-Media Publ., 2012; Ch.15, 809–817. – (Natsional'noe rukovodstvo). (In Russian).
4. *Borovkova N.V., Khvatov V.B., Aleksandrova I.V.,* et al. Apoptoz mononuklearov i soderzhanie pogibshikh leykotsitov v venoznoy krovi bol'nykh s sepsisom [Apoptosis of mononuclear leukocytes and content of those killed in the venous blood of patients with sepsis]. Vestnik RAMN. 2009; 8: 33–36. (In Russian).
5. *Borovkova N.V., Aleksandrova I.V., Valetova V.V.,* et al. Apoptoz limfotsitov krovi v norme i pri patologii [Apoptosis of lymphocytes in normal and pathological conditions]. Molekulyarnaya meditsina. 2013; 4: 41–45. (In Russian).
6. *Borovkova N.V.* Osobennosti issledovaniya apoptoza limfotsitov u khirurgicheskikh bol'nykh [Features of lymphocyte apoptosis study in surgical patients]. Sovremennaya laboratoriya. 2014; 1: 52–55. – (Meditsinskiy alfavit). (In Russian).
7. *Susin S.A., Zamzami N., Castedo M.,* et al. The central executioner of apoptosis: multiple connections between protease activation and mitochondria in Fas / APO-1/CD95 – and ceramide-induced apoptosis. J Exp Med. 1997; 186 (1): 25–37.
8. *Itoh N., Yonehara S., Ishii A.,* et al. The polypeptide encoded by the cDNA for human surface antigen FAS can mediate apoptosis. Cell. 1991; 66 (2): 233–243.
9. *Lecoeur H., Ledru E., Prévost M.C., Gougeon M.L.* Strategies for phenotyping apoptotic peripheral human lymphocytes comparing ISNT, annexin-V and 7-AAD cytofluorometric staining methods. J Immunol Methods. 1997; 209 (2): 111–123.
10. *Zelenin A.V., Poletaev A.I., Stepanova N.G.,* et al. 7-Amino-actinomycin D as a specific fluorophore for DNA content analysis by laser flow cytometry. Cytometry. 1984; 5 (4): 348–354.
11. *Morse E.E., Yamase H.T., Greenberg B.R.,* et al. The role of cytometry in the diagnosis of lymphoma: a critical analysis. Ann Clin Lab Sci. 1994; 24 (1): 6–11.
12. *Cheredeev A.N.,* Koval'chuk L.V. Apoptoz kak vazhnyy etap otsenki immunnoy sistemy po patogeneticheskomu printsipu [Apoptosis is an important stage of the evaluation of the immune system to a pathogenetic principle]. Klinicheskaya laboratornaya diagnostika. 1997; 7: 31–35. (In Russian).
13. *Badalyan A.V., Luzhnikov E.A.,* Gol'dfarb Yu.S., et al. Izmeneniya pokazateley gomeostaza v reabilitatsionnom periode pri ostrykh otravleniyakh khimicheskoy etiologii [Changes in homeostasis in the rehabilitation period of acute poisonings of chemical etiology]. Anesteziologiya i reanimatologiya. 2013; 3: 43–50. (In Russian).

A.V. Badalyan[1,2], N.V. Borovkova[1], Yu.S. Goldfarb[1,2], Yu.V. Andreev[1], A.N. Elkov[1]

MALFORMATIONS OF CELLULAR COMPONENTS OF TOXEMIA AND THEIR CORRECTION AT ACUTE POISONINGS IN REHABILITATION PERIOD

[1] N.V. Sklifosovsky Research Institute of Emergency Medicine, Public Healthcare Institution of the Moscow Healthcare Department, 129090, Moscow, Russian Federation
[2] State Budgetary Educational Institution of Additional Professional Education «Russian Medical Academy of Postgraduate Education», RF Ministry of Health, 123242, Moscow, Russian Federation

Observations on 59 patients suffering from a severe poisoning by various toxic agents, who were admitted to a rehabilitation toxicological department of N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine were generalised. Those agents were psychopharmacological drugs (13), cauterizing liquids (18) and neurotoxicants (narcotics of opium group, ethanol, psychopharmacological (28). All the patients showed signs of endotoxemia of moderate severity: mean concentration of leukocytes in venous blood slightly exceeded normal limits and an increased concentration of dead cells in blood as well as of lymphocytes expressing Fas-surface receptor were noted. The obtained data were used to evaluate the effectiveness of non-drug therapeutic methods (laser hemotherapy, mesodiencephalic modulation, hyperbaric oxygen therapy) and pharmacotherapy (mexidol). Correction of endotoxemia using the above-mentioned methods in the complex therapy can significantly reduce the rehabilitation time in patients and may have a positive effect on the duration of hospital treatment.

Keywords: *acute poisonings, diagnosis, treatment, endotoxemia, cellular components of toxemia.*

Материал поступил в редакцию 15.06.2015 г.

УДК 615.099.036.11

ТАКТИКА ИНФУЗИОННОЙ ТЕРАПИИ НА ДОГОСПИТАЛЬНОМ ЭТАПЕ ПРИ ОТРАВЛЕНИЯХ УКСУСНОЙ КИСЛОТОЙ

Е.Ю. Михеев[2], С.В. Мищенко[2], Ю.П. Орлов[1]

[1]Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 644099, *г. Омск, Российская Федерация*
[2]БУЗОО Городская клиническая больница скорой медицинской помощи № 1, 644092, г. Омск, Российская Федерация

В статье проведен анализ влияния различных вариантов инфузионной терапии на догоспитальном этапе при острых отравлениях уксусной кислотой на показатели центральной гемодинамики и тяжесть ацидоза. Выявлено, что наиболее эффективная коррекция ацидоза и положительное влияние на гемодинамические показатели (увеличение СИ, УО, ЦВД) отмечается при использовании на догоспитальном этапе сбалансированного полионного раствора Реамберина.

Ключевые слова: *отравление уксусной кислотой, ацидоз, Реамберин, гемодинамика.*

Введение. Широкая доступность и частое использование в домашнем хозяйстве концентрированной уксусной кислоты (УК) обусловливает частые случаи (70% среди всех отравлений веществами прижигающего действия) тяжелой химической травмы, при которых летальность составляет 6,6% – 16,2% по данным клиник Санкт-Петербурга, Екатеринбурга, Омска. В восточных регионах (Читинская область) летальность достигает 43,4-60,3% [8,12], а степень инвалидизации превышает 40% из числа выживших пациентов [4].

Основными механизмами развития отравления УК являются расстройства общего кровообращения и микроциркуляции, гемолиз, гипоксия и эндогенная интоксикация, что обусловлено высокой резорбционной способностью кислоты [12]. Абсолютная гиповолемия, формирующиеся при отравлениях уксусной кислотой, ведет к централизации кровообращения [2]. Последнее, приводит к существенным нарушениям регионарного и периферического кровотока. В результате массивной плазмопотери и выраженного болевого синдрома происходит уменьшение объема циркулирующей крови (ОЦК), снижение сердечного индекса (СИ), ударного (УО) и минутного объема сердца, центрального венозного давления (ЦВД) и скорости кровотока, что формирует развитие экзотоксического шока по гиповолемическому типу [5] с характерными для шока расстройствами микроциркуляции и глубокого ацидоза [4, 7].

Нарастающие нарушения микроциркуляции в крайне короткий период времени приводят к развитию «окислительного» стресса, который сопровождается тканевой гипоксией, активацией анаэробного гликолиза и накоплением лактата, активацией процессов свободно-радикального окисления (СРО), образованием активных форм кислорода (АФК), индуцирующих перекисное окисление липидов (ПОЛ) с последующим повреждением клеточных мембран и гибелью клетки [9,10]. Скорость развития этих патологических процессов очень велика, что требует быстрой и универсальной патогенетически обоснованной коррекции. При отравлении УК выявлено развитие синдрома нарушения утилизации жирных кислот миокардом со значительным повышением их в крови, увеличение продуктов ПОЛ,

Михеев Евгений Юрьевич (Miheev Evgenij Jur'evich), аспирант кафедры анестезиологии и реаниматологии Омского государственного медицинского университета, 644099, г. Омск, Российская Федерация; врач анестезиолог-реаниматолог отделения реанимации и интенсивной терапии Омского центра для лечения острых отравлений БУЗОО Городская клиническая больница скорой медицинской помощи № 1, 644092, г. Омск, Российская Федерация, ogma@mail.ru
Мищенко Сергей Викторович (Mishhenko Sergej Viktorovich), заведующий отделением реанимации и интенсивной терапии Омского центра для лечения острых отравлений БУЗОО Городская клиническая больница скорой медицинской помощи № 1, 644092, г. Омск, Российская Федерация, dr.msv1977@yandex.ru
Орлов Юрий Петрович (Orlov Jurij Petrovich), доктор медицинских наук, профессор кафедры анестезиологии и реаниматологии Омского государственного медицинского университета, 644099, г. Омск, Российская Федерация, orlov-up@mail

особенно при тяжелом отравлении. Не менее важным является определение такого факта, как значительное снижение АТФ, АДФ и коэффициента энергетического заряда эритроцитов. Последний параметр характеризует степень нарушения процессов генерации энергии. Поэтому, безусловно, что правильная тактика инфузионной терапии на догоспитальном этапе, будет определять дальнейший успех или неблагоприятный исход в последующем.

В этой связи большой интерес представляет использование при отравлениях УК препаратов янтарной кислоты и, в первую очередь, реамберина, поскольку в последние годы появились сообщения об его прямом и опосредованном гемодинамическом действии (в качестве антиоксиданта и корректора энергодефицита) при ряде критических состояний [9, 10].

Цель исследования – определение эффективности реамберина как стартового инфузионного препарата на догоспитальном этапе (ДГЭ) при отравлениях УК и оценка его влияния на глубину ацидоза и центральную гемодинамику в раннем (до суток) посттравматическом периоде.

Материал и методы исследования. Для решения поставленной задачи нами было проведено открытое перспективное исследование у 60 пациентов (30 женщины и 30 мужчин) с тяжелыми отравлениями УК, находившихся на лечении в отделении реанимации и интенсивной терапии в центре лечения острых отравлений БСМП №1 в период с 2008 по 2012 годы. Объем принятой внутрь концентрированной УК (по данным анамнеза) колебался от 25 до 70 мл. На этапе скорой помощи проводилась стандартная терапия, включающая анальгезию (промедол 2%-0,3 мг/ кг), гормонотерапию (преднизолон 1-2 мг/ кг), атропин 0,14 мг/кг в/в. Время этапа транспортировки, как и время проведения инфузионной терапии, составило 32±6 минут. Средний возраст пациентов составил 34,1±10 года.

Пациенты были разделены на четыре клинические группы с учетом тактики инфузионной терапии. В I группу были включены 15 пациентов (32±5,3 года), которым на ДГЭ инфузионная терапия не проводилась по разным причинам (короткое время доезда до стационара, недооценка тяжести состояния пациента). Во II группу вошли 15 пациентов (31,8±6,1 года), которым на ДГЭ инфузионная терапия проводилась раствором натрия хлорида 0,9% в среднем объеме 550±50 мл. III группу составили 15 человек (30, 2±7,1 лет), которым на ДГЭ инфузионная терапия проводилась 4% раствором модифицированного желатина (Гелофузин) в объеме 500±50 мл. IV группа пациентов была сформирована в количестве 15 человек (31,8±4,6 года), которым на ДГЭ стартовая инфузионная терапия проводилась 1,5% раствором Реамберина в объеме 500±50 мл.

Критерии включения. В исследование включались пациенты обоего пола в возрасте до от 18 до 50 лет, поступавшие в клинику в период до 3,5 часов от момента химической травмы, со степенью внутрисосудистого гемолиза не менее 200 мг%. Во всех случаях отравлений тяжесть внутрисосудистого гемолиза оценивалась по классификации Е.А. Лужникова (1998), а тяжесть общего состояния пациентов – на основании шкалы тяжести общего состояния APACHE II.

Критерии исключения. В исследование не включались пациенты, поступавшие в клинику в период более 3,5 часов от момента химической травмы, исходно с клинической картиной декомпенсированного экзотоксического шока, с концентрацией свободного гемоглобина в крови более 2500 мг%, с хроническими заболеваниями печени, крови, заболеваниями с расстройствами психики, с сопутствующей острой соматической патологией (внебольничная пневмония, острые респираторные заболевания), а также с легкой степенью внутрисосудистого гемолиза, имевших концентрацию свободного гемоглобина менее 200 мг% и тяжесть общего состояния менее 12,5 баллов по шкале APACHE II.

В нашей работе все контрольные биохимические, функциональные и гематологические исследования были выполнены на 15 здоровых лицах (доноры крови) аналогичного возраста, что и у больных. Это было сделано с целью сравнения исследуемых показателей общего состояния здоровья и констант гомеостаза здоровых (контроль) и изучаемых функциональных и лабораторных параметров больных с острым отравлением уксусной кислотой.

Тяжесть общего состояния всех пациентов с тяжелым отравлением УК в раннем посттравматическом периоде была обусловлена наличием экзотоксического шока, эндо- или экзотоксикоза, гиповолемей, дыхательной и циркуляторной недостаточностью, энцефалопатией, нефропатией, гепатопатией различной степени выраженности, синдромом водно-электролитных нарушений, с преобладанием гипонатриемии и гиперкалиемии [2]. На момент госпитализации оценивали тяжесть общего состояния по шкале APACHE II, уровень гемолиза в крови (по концентрации свободного гемоглобина), частоту сердечных сокращений (ЧСС), уровень центрального венозного давления (ЦВД) общепринятыми методами и параметры центральной гемодинамики: удельное периферическое сопротивление (УПС), ударный индекс (УИ), сердечный индекс (СИ) методом интегральной реографии и газовый состав артериальной крови.

Полученные данные обработаны с помощью общепринятых в медико-биологических исследованиях методов системного анализа с использованием программ «Microsoft Excel» и «Statistica 6.0». Анализ на нормальность распределения количественных признаков проведен с использованием критерия Колмогорова-Смирнова и критерия Шапиро-Уилка. Различия между независимыми выборками определяли с помощью критерия Манна-Уитни и рангового дисперсионного анализа Краскела-Уоллиса (ANOVA), а между зависимыми группами – с помощью критерия Вилкоксона и дисперсионного анализа Фридмана (ANOVA). Критический уровень значимости статистических гипотез в данном исследовании принимался равным при $p<0,05$, так как при этом вероятность различия была более 95%.

Результаты и обсуждение. Как отмечалось выше, тяжесть общего состояния при отравлении УК определяется многими факторами [2]. Из данных таблицы 1 следует, что в IV группе (пациенты, получавшие реамберин на догоспитальном этапе) тяжесть общего состояния по шкале APACHE II [25 (13; 34)] была существенно ниже, чем в других группах, как и уровень внутрисосудистого гемолиза, который более чем в 2 раза был ниже данных в I и III группах и статистически не отличался от аналогичного показателя во II группе (табл. 1).

Безусловно, отсутствие инфузионной терапии на догоспитальном этапе у пациентов I группы, в сочетании с высоким уровнем свободного гемоглобина, как неблагоприятные факторы, обусловили более тяжелое течение химической травмы. В противоположность этому, обращает на себя внимание факт наличия невысокого уровня свободного гемоглобина во II и IV группах на фоне инфузионной терапии, в первом случае – физиологического раствора 0,9% натрия хлорида и, во втором – инфузии реамберина и, при этом отмечается существенная разница в баллах по шкале APACHE II. В III группе, где на догоспитальном этапе использовали раствор модифицированного желатина с целью достижения волемического эффекта, уровень свободного гемоглобина был в 5 и в 3 раза выше, чем во II и IV группах соответственно.

Прямого объяснения этому факту мы не нашли, но можно предположить, что растворы кристаллоидов на фоне гипонатриемии, характерной для отравления УК, влияют на механизм гемолиза, увеличивая уровень натрия в плазме крови и влияя на градиент концентрации ионов натрия, что препятствует их проникновению внутрь эритроцита в условиях ацидоза. Преимущество раствора реамберина представляется на наш взгляд и тем фактом, что он не способствует, как «физиологический раствор» 0,9% натрия хлорида, развитию дилютационного ацидоза [18]. В ряде исследований было показано (Prough D.S., Bidani A., 1999), что проведение длительной инфузионной терапии с использованием «физиологического» 0,9% раствора натрия хлорида в больших объемах, например, у хирургических больных с ацидозом, приводило к развитию гиперхлоремического гиперволемического ацидоза. Это было связано не столько с дилюцией бикарбоната, сколько с повышенным поступлением хлора и компенсаторной экскрецией бикарбоната почками [18]. И это логично, так как для организма алкалоз страшнее ацидоза. Последнее, как известно, можно предотвратить, используя только адекватные концентрации предшественников бикарбоната – метаболизируемых анионов для замещения $HCO3^-$.

В ходе дальнейшего обобщения полученных данных оказалось, что в течение первых суток пациенты IV группы потребовали меньшей по объему инфузионной терапии (4110±350 мл) на стационарном этапе (табл. 2), чем пациенты

Таблица 1

Показатели тяжести общего состояния по APACHE II и уровень гемолиза при поступлении в стационар

Показатель	I группа (n=15)	II группа (n=15)	III группа (n=15)	IV группа (n=15)
APACHE II	40(22;61)	36(24;49)	30 (21;45)*	25(13;34)*
Свободный гемоглобин крови (мг%)	1040 (485; 1400)	208 (135;1500)*	1085 (300;1348)	4 434 (150;690)*

Примечание: наличие статистически значимых различий по сравнению с I группой: *- $p<0,05$. Критерий Манна-Уитни.

Таблица 2

Объем инфузионной терапии в условиях стационара у пациентов с отравлением уксусной кислотой в течение суток после отравления (M±δ)

Растворы	I группа (n=15)	II группа (n=15)	III группа (n=15)	IV группа (n=15)
Кристаллоиды, (мл) из них бикарбонат натрия 4%	4765±250 740±110	4450±200 510±60	3530±150* 420±40	3530±220*^ -
Коллоиды, (мл)	1500±350	1100±350	1100±350	500±110*^ 0
Плазма, (мл)	830±50	430±50*	180±60*	80±30* a^0
Эритромасса, (мл)	145±45	65±15*	0	0
Общий объем, (мл)	7240±695	6045±615*	4750±560*	4110±350*^

Примечание: наличие статистически значимых различий по сравнению с I группой: *- p<0,05; a- p<0,001; – наличие статистически значимых различий по сравнению со II группой: ^- p<0,05; – наличие статистически значимых различий по сравнению с III группой: 0- p<0,05. Критерий Манна-Уитни.

остальных групп, так как волемический статус в этой группе пациентов выглядел более благоприятно (табл. 3). Также отрадно, что в IV группе степень тяжести анемии, как и дефицит факторов свертывания на фоне минимальной кровопотери был не существенным, что не потребовало проведения заместительная гемотрансфузии, а плазмотрансфузия была минимальная (80±30 мл). Данный факт был подтвержден нами раннее [19]. По-видимому, это связано с меньшим развитием осложнений, таких как желудочно-кишечное кровотечение, что указывает на максимальный защитный эффект инфузированного раствора реамберина, как антиоксиданта, на систему гемостаза, чувствительного к активности свободно-радикального окисления, которое влияет, в частности, на окисление фибриногена и усиление тромбообразования [20].

При проведении попарного сравнения показателей центральной гемодинамики было выявлено, что в раннем периоде после отравления УК наибольший показатель УПС (дин•с·см$^{-5}$/м^2) отмечался в I группе, а наименьший – в IV, где он был на 14,4% (при p=0,0064) меньше, по сравнению с I группой. В данном случае можно предположить, что отсутствие инфузионной терапии может оказывать значительное влияние на развитие экзотоксического шока в короткий период времени, что согласуется с данными других исследований [8, 10]. Более того, показатели УПС в IV группе оказались на 9,4% меньше (p=0,0024) по сравнению с данными II группы и на 3,6% (при p=0,08) меньше, при сравнении аналогичного показателя в III группе, что свидетельствует о лучшем, чем у модифицированного желатина, влиянии реамберина на реологические свойства крови, что было отмечено и при других критических состояниях [1,3]. Полученные данные лишний раз подтверждают, что в остром периоде химической травмы на фоне повышенной сосудистой проницаемости и секвестрации плазмы в интерстициальное пространство, формируется относительная и абсолютная гиповолемии и, как следствие, централизация кровообращения, что приводит к существенным нарушениям регионарного и периферического кровотока. Нарастающие нарушения микроциркуляции сопровождаются тканевой гипоксией, активацией анаэробного гликолиза, образованием активных форм кислорода (АФК), которые одновременно запускают процессы СРО с последующим повреждением клеточных мембран и гибелью клетки [2,9,12].

В дальнейшем исследовании параметров гемодинамики было выявлено, что и наименьшие значения УИ и СИ были также зарегистрированы у пациентов I группы, не получавших инфузионную терапию и в сочетании с уровнем УПС [900 (860; 960) дин•с·см$^{-5}$/м^2], полученные результаты следует трактовать как проявления экзотоксического шока. Во II группе УИ и СИ были выше на 20,8% (p=0,0001), чем в I группе. В III группе СИ превышал аналогичный показатель в I группе уже на 45,8% (p=0,000003), но наибольшие значение СИ было отмечено

Таблица 3

Характеристика гемодинамических показателей у пациентов с отравлением уксусной кислотой, на 1-е сутки химической травмы

Показатель	Контроль (n=15)	I группа (n=15)	II группа (n=15)	IIIгруппа (n=15)	IV группа (n=15)
УИ, мл/м ^{2}	50,3 (39;54)	24 (22; 26)	29 (27; 30)^a	35(33;36)$^{a\,\beta}$	38 (37; 39)$^{a\,\beta\,000}$
СИ, л/мин·м^2	3,7(3,2;4,2)	2,3 (2,1; 2,4)	2,4 (2,3; 2,6)	2,9(2,7;3,0)$^{a\,\beta}$	3,1 (2,9; 3.2)$^{a\,\beta\,0}$
ЧСС, мин$^{-1}$	75 (68;80)	96 (94; 97)	86 (84; 87)^a	85 (80; 86)^a	82 (80; 85)^{a} ^^
АД ср., мм рт. ст.	92(90;96)	79 (76; 80)	82 (80; 87)**	88 (85; 91)^{a} ^	88 (84; 90)^a
ЦВД, см вод. ст.	8,6 (6,7:9,0)	1,0 (1,0; 2.0)	2,0 (2,0; 3,0)*	2,0 (2,0; 3,0)**	3,0 (2,0; 4,0)^{a} ^^{0}

Примечание: наличие статистически значимых различий по сравнению с I группой: *- p<0,05; ** – p<0,01; ^{a}- p<0,001; – наличие статистически значимых различий по сравнению со II группой: ^- p<0,05; ^^ – p<0,01; β- p<0,001; – наличие статистически значимых различий по сравнению с III группой: ^{0}- p<0,05; ^{00} – p<0,01; ^{000} – p<0,001. Критерий Манна-Уитни.

Таблица 4

Показатели газового состава артериальной крови пациентов с отравлением уксусной кислотой при поступлении в клинику

Показатель	Контроль (n=15)	I группа (n=15)	II группа (n=15)	III группа (n=15)	IV группа (n=15)
pH	7,34±0,02	7,14±0,02	7,24±0,02	7,24±0,02	7,30±0,02
BE	2,7±1,8	-14,4±2,2	-12,2±2,1	-11,8±1,9	-4,1±1,2
pO_2	92,4±3,1	79,2±3,5	82,4±2,9	90,4±3,6	102,1±4,2
pCO_2	39,2±4,4	47,8±2,7	43,3±2,4	43,6±3,1	41,3±2,2
HCO^{3-}, ммоль/л	22,80±1,0	16,3±1,4	19,2±1,7	19,5±1,5	23,1±1,4

Примечание: наличие статистически значимых различий по сравнению с I группой: *- p<0,05; ** – p<0,01; ^{a}- p<0,001; – наличие статистически значимых различий по сравнению со II группой: ^- p<0,05; ^^ – p<0,01; $^{\beta}$- p<0,001; – наличие статистически значимых различий по сравнению с III группой: ^{0}- p<0,05; ^{00} – p<0,01; ^{000} – p<0,001. Критерий Манна-Уитни.

в IV группе, где он превышал данные в I группе на 58,3% (p=0,000003) (табл.3).

Для пациентов I группы также была характерна выраженная тахикардия, у пациентов же II, III и IV групп показатель ЧСС был значительно ниже, но статистически между группами не отличался. Наименьшие уровени АДср и ЦВД отмечались в I группе, а наибольшее значения АДср были зарегистрированы в III группе, которые были выше на 11,4%, чем в I группе (p=0,00036) и статистически не отличались от данных II и IV групп. Но наибольшее значение ЦВД было за-

регистрировано, опять же, в IV группе, которое превышало аналогичный показатель в I группе в 3 раза (p=0,00008), но статистически не имело различий с другими группами.

Таким образом, в раннем периоде после химической травмы (первые 2-3 часа), в группе пациентов, получавших реамберин на догоспитальном этапе, гемодинамические показатели были более стабильные и приближенные к норме. Это значительно уменьшает риск развития дальнейших гемодинамических нарушений, и соответственно, уменьшает риск развития ПОН в последующем [1,3].

В литературе имеется информация о влиянии реамберина на гемодинамику путем опосредованного воздействия на ряд биохимических трансформаций (нормализации энергетического пула, активации аэробного метаболизма, раннее устранение метаболического ацидоза, улучшение реологических свойств крови и доставки энергетических компонентов в лице сукцината и кислорода к пострадавшим клеткам большинства органов). Также антиоксидантная активность янтарной кислоты проявляется в связывании свободных радикалов, тем самым уменьшая активность СРО. По данным источников при введении реамберина существенно снижается концентрация в крови продуктов Флипопероксидации (диеновых конъюгат (ДК) и малонового диальдегида (МДА) [1,3]. По нашему мнению и, по мнению ряда авторов, это оказывает положительное влияние на систолическую и диастолическую функции миокарда, что, в свою очередь, способствует восстановлению сердечно-сосудистой деятельности, улучшению микроциркуляции, в том числе, и в самом миокарде [11,14].

В нашем исследовании мы подтвердили указанное свойство реамберина. Раннее использование реамберина в качестве стартового инфузионного раствора приводит к положительным изменениям со стороны гемодинамики, возможно, вследствие снижения процессов липопероксидации [9,10], снижения токсического действия продуктов ПОЛ на мембраны кардиомиоцитов [11] и к более быстрому восстановлению сократительной функции сердца.

Кроме того, результаты исследования указывают на наличие прямого волемического эффекта реамберина. Как известно, отрицательные заряды, возникающие в молекуле сывороточных белков в результате сукцинилирования под действием янтарной кислоты, способствуют увеличению молекулы в размерах (при сохранении исходной молекулярной массы). Таким образом, формируются более объемные белковые цепи, в результате чего занимаемый ими объем значительно увеличивается, чем обеспечивается волемический эффект [6]. В данном случае, этот эффект более выражен у реамберина (обеспечивающего реакцию сукцинилирования относительно всех белковых субстанций плазмы крови), чем у гелофузина, раствора модифицированного (сукцинилированного) желатина, где эффект сукцинилирования завершен на этапе производства раствора [6].

При оценке параметров газового состава артериальной крови у пациентов с отравлением уксусной кислотой на фоне различных инфузированных растворов, был отмечен положительный эффект по влиянию на показатели ацидоза только при использовании реамберина, что сопровождалось улучшением всех исследуемых параметров. Конечно, у пациентов I группы, где инфузия вообще не проводилась, говорить о каком-то купировании ацидоза не приходится. Но и во II и в III группах отмечался явно недостаточный эффект по купированию ацидоза, что подтверждалось сохранением, как дефицита оснований, так и относительным высоким уровнем pH и напряжением углекислоты. В данном случае, безусловно, отсутствие в растворах, используемых у пациентов II и III групп носителей щелочи, исключает какую-либо возможность для купирования ацидоза. У пациентов же IV группы, введение за короткий период времени 500 мл 1,5 раствора реамберина, соответствует введению 67 ммолей бикарбоната, что быстрее устраняет имеющийся дефицит бикарбонатов в условиях ацидоза. Показатель pH артериальной крови у пациентов IV группы составил 7,30±0,02 , что свидетельствует о субкомпенсированном ацидозе по сравнению с другими группами, где наблюдался декомпенсированный ацидоз. Данный факт был подтвержден и в других исследованиях [15,17].

Выводы. 1. Отравление уксусной кислотой является тяжелой химической травмой, что всегда требует проведения инфузионной терапии, отсутствие которой на догоспитальном этапе, чревато развитием тяжелых расстройств со стороны центральной гемодинамики.

2. При использовании реамберина на догоспитальном этапе в случаях отравлений уксусной кислотой выявлен прямой и опосредованный гемодинамический эффект, заключающийся в быстром восстановлении показателей УО, СИ и ЦВД, нарушенных в период развития гиповолемии.

3. Сравнительная оценка различных растворов, используемых на этапе скорой медицинской помощи показала, что использование реамберина, как стартового инфузионного раствора при отравлениях уксусной кислотой, является более предпочтительным вариантом, так как способствует более радикальному устранению метаболического ацидоза.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Afanas'ev V. V. Clinical efficacy of Reamberin. SPb.: Taktik – Studio; 2005.
2. *Белова М. В., Ильяшенко К. К., Лужников Е. А., Ельков А. Н., Годков М. М., Клычникова Е. В., Матвеев С. Б.* Роль окислительного стресса в системном ответе организма при острых отравлениях психотропными препаратами и веществами прижигающего действия. Токсикологический вестник. 2013; 1: 7–14.
3. *Заплутанов В. А.* Реамберин: экспериментальные и клинические исследования реферативный сборник научных работ, процитированных в PubMed (база данных медицинских и биологических публикаций) СПб.: Тактик – Студио; 2005.
4. *Ларченко Н. А.* Мониторинг кислородного баланса при отравлениях уксусной кислотой: автореф. дис. ... канд. мед наук. Екатеринбург, 2006.
5. *Лужников Е. А.,* ред. Клиническая токсикология: монография. М. : МИА, 20
6. 6.Мамцис А. М., Николаева В. В., Андреев С. М., Галкин О. М., Вайнерман Е. С., Рогожин С. В. Способ выделения белков и нуклеиновых кислот из белково- нуклеиновых смесей. Патент № 8889Государственный комитет СССР по делам изобретений и открытий. 15.12.81.
7. *Провадо А. В.* Морфофункциональные изменения в паренхиматозных органах при острых отравлениях уксусной кислотой в различные стадии стресс-реакции: автореф. дис. ... канд. мед наук. Иркутск, 20
8. *Сабаев А. В.* Динамика летальности по данным центра острых отравлений города Омска за 2002-2011 гг. Сибирский медицинский журнал. 2013, 3: 79-81.
9. *Саприн А. Н.* Окислительный стресс и его роль в механизмах апоптоза и развитии патологических процессов. Успехи биолологической химии. 1999, 39: 289-326.
10. *Сачков Н. В.* Этиология и патогенез полиорганной дисфункции. Новости анестезиологии и реаниматологии. 2007, 2: 20-33.
11. *Сидоренко Г. И.* Фармакологическая защита миокарда реамберином при коронарном шунтировании у пациентов с постинфарктной стенокардией. Терапевтический архив. 2011, 9: 35-40.
12. *Соколова Н. А.* Динамика показателей свободных жирных кислот и макроэргических фосфатов в крови больных с острым отравлением уксусной кислотой. Токсикологический вестник. 2011,5 (110): 8-10.
13. *Соколова Н. А., Витковский Ю. А., Говорин А. В., Бойко Е. В.* Роль некоторых метаболических нарушений в развитии сердечных аритмий у больных с острым отравлением уксусной кислотой. Сибирский медицинский журнал. 2010, 8: 20-23.
14. *Сударева С. Ю.* Экспериментальное обоснование эффективности эмоксипина, димефосфона, мексидола, α-токоферола на динамику некоторых функциональных показателей при остром отравлении уксусной кислотой. В кн.: сб. тез. 2-го Съезда Российского Научного Общества фармакологов, 21-25 апреля, М.; 20Часть II: 202.
15. *Шах Б. Н., Лапшин В. Н., Кырнышев А. Г., Смирнов Б. Д., Кравченко-Бережная Н. Р.* Метаболические эффекты субстратного антигипоксанта на основе янтарной кислоты. Общая реаниматология. 2014; Т. 10 (1): 33-42.
16. *Уразаев Т. Х.* Клинико-лабораторные тесты в оценке состояния больных с острым отравлением уксусной кислотой: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Екатеринбург, 20
17. *Яковлев А. Ю. , Улитин Д. Н.* Реамберин: результаты клинических исследований в хирургии и интенсивной терапии за последние пять лет. Медицинский алфавит. Неотложная медицина. 2012; 3: 54-58.
18. *Prough D.S., Bidani A.* Hyperchloremic metabolic acidosis is a predictable consequence of intraoperative infusion of 0.9% saline. Anesthesiology. 1999; 90(5):1247-1249.
19. *Орлов Ю. П., Лукач В. Н., Михеев Е. Ю., Мищенко С. В.* Метаболические и органопротективные свойства различных инфузионных растворов и выбор стартовой терапии на догоспитальном этапе при отравлениях уксусной кислотой. Анестезиология и реаниматология. 2014; 4: 29-33.
20. *Азизова О. А., Швачко А. Г., Асейчев А. В.* Влияние ионов железа на фунциональную активность тромбина. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2009; 148 (11): 121-130.

REFERENCES:

1. Afanas'ev V.V. Clinical efficacy of Reamberin. SPb.: Taktik – Studio; 2005 (in Russian).
2. *Belova M.V.,* Il'jashenko K.K., Luzhnikov E.A., El'kov A.N., Godkov M.M., Klychnikova E.V., Matveev S.B. The role of oxidative stress in the system response of the organism in acute poisoning by psychotropic drugs and corrosive substances action. Toksikologicheskij vestnik. 2013; 1: 7–14 (in Russian).
3. *Zaplutanov V.A.* Reamberin: experimental and clinical study abstract collection of scientific papers cited in PubMed (database of medical and biological publications). SPb.: Taktik – Studio; 2005 (in Russian).
4. *Larchenko N.A.* Monitoring of oxygen balance in case of poisoning with acetic acid Cand. med. sci. diss. Ekaterinburg, 2006 (in Russian).
5. *Luzhnikov E.A.,* red. Clinical Toxicology: monograph. M. : MIA, 2008 (in Russian).
6. 6.Mamcis A.M., Nikolaeva V.V., Andreev S.M., Galkin O.M., Vajnerman E.S., Rogozhin S.V. A method for isolating proteins and nucleic acids from protein-nucleic mixtures. Patent USSR, 888909,1981 (in Russian).
7. *Provado A.V.* Morphological changes in parenchymal organs in acute poisoning with acetic acid in the various stages of stress reaction. Cand. med. sci. diss. Irkutsk, 2007 (in Russian).
8. *Sabaev A.V.* The dynamics of mortality according to the center of acute poisoning in Omsk for 2002-2011 gg. Sibirskij medicinskij zhurnal. 2013, 3: 79-81 (in Russian).
9. *Saprin A.N.* Oxidative stress and its role in apoptotic mechanisms and the development of pathological processes. Uspehi biolologicheskoj himii. 1999, 39: 289-326 (in Russian).
10. *Sachkov N.V.* The etiology and pathogenesis of multiple organ dysfunction. Novosti anesteziologii i reanimatologii. 2007, 2: 20-33 (in Russian).
11. *Sidorenko G.I.* Pharmacologic myocardial protection during coronary artery bypass reamberin in patients with post-infarction angina. Terapevticheskij arhiv. 2011, 9: 35-40 (in Russian).
12. *Sokolova N.A.* Dynamics of indicators of free fatty acids and high-energy phosphates in the blood of patients with acute poisoning with acetic acid. Toksikologicheskij vestnik. 2011,5 (110): 8-10 (in Russian).
13. *Sokolova N.A., Vitkovskij Ju.A., Govorin A.V., Bojko E.V.* The role of some metabolic abnormalities in the development of cardiac arrhythmias in patients with acute poisoning with acetic acid. Sibirskij medicinskij zhurnal. 2010, 8: 20-23 (in Russian).
14. *Sudareva S.Ju.* Experimental evaluation of the effectiveness emoxipine, dimefosfona, mexidol, α-tocopherol on the dynamics of some functional parameters in acute poisoning with acetic acid. In: 2nd Congress of the Russian Society of Pharmacology 21-25 april, Moscow, 2003; 202 (in Russian).
15. *Shah B.N., Lapshin V.N., Kyrnyshev A.G., Smirnov B.D., Kravchenko-Berezhnaja N.R.* Metabolic effects of Substrate antihypoxant based succinic acid. Obshhaja reanimatologija 2014; T. 10 (1): 33-42 (in Russian).
16. *Urazaev T.H.* Clinical and laboratory tests in the assessment of patients with acute poisoning with acetic acid:avtoref. Cand. med. sci. diss. Ekaterinburg, 2004 (in Russian).
17. *Jakovlev A.Ju. , Ulitin D.N.* Reamberin: results of clinical trials in surgery and intensive care for the past five years. Medicinskij alfavit. Neotlozhnaja medicina. 2012; 3: 54-58 (in Russian).
18. *Prough D.S., Bidani A.* Hyperchloremic metabolic acidosis is a predictable consequence of intraoperative infusion of 0.9% saline. Anesthesiology. 1999; 90(5):1247-1249.
19. *Orlov Ju.P., Lukach V.N., Miheev E.Ju., Mishhenko S.V.* Metabolic and protective properties of various infusion solutions and the selection of the starting therapy in the prehospital phase in case of poisoning with acetic acid. Anesteziologija i reanimatologija. 2014; 4: 29-33 (in Russian).
20. *Azizova O.A., Shvachko A.G., Asejchev A.V.* The influence of iron ions on functional activity of thrombin. Bjulleten' jeksperimental'noj biologii i mediciny. 2009; 148 (11): 121-130 (in Russian).

E.Ju. Miheev[2], S.V. Mishchenko[2], Ju.P. Orlov[1]

TACTICS OF INFUSION THERAPY AT THE PRE-HOSPITAL STAGE AT POISONINGS WITH ACETIC ACID

[1]Omsk State Medical University, RF Ministry of Health, 644099, Omsk, Russian Federation
[2]Municipal Clinical Hospital for Emergency Medicine, 644092, Omsk, Russian Federation

The article describes the influence of different versions of infusion therapy of poisonings with acetic acid on central hemo dynamics indicators and acidosis severity at the pre-hospital stage . It was found out that the use of a balanced Reamberin polyionic solution allowed to achieve the most efficient correction of acidosis and a positive effect on hemodynamic indicators-cardiac index(CI), cardiac stroke volume in a minute (SV), central venous pressure (CVP).

Keywords: *poisoning with acetic acid, acidosis, Reamberin, hemodynamics.*

Переработанный материал поступил в редакцию 29.09.2015 г.

УДК 613.6 :615.91

ЦИТОПАТОЛОГИЯ ЭРИТРОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ И ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ ГЛУТАТИОН-S-ТРАНСФЕРАЗ У РАБОТНИКОВ ПРЕДПРИЯТИЯ ПО ПРОИЗВОДСТВУ И УТИЛИЗАЦИИ РТУТИ

Н.Н. Ильинских[1,3], Е.Н. Ильинских[1,2], И.Н. Ильинских[1], О.В. Гвоздарева[1]

[1]ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 634050, г. Томск, Российская Федерация
[2]ФГАОУВО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет» Министерства образования и науки РФ, 634050, г. Томск, Российская Федерация
[3]ФГАОУВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет» Министерства образования и науки РФ, 634050, г. Томск, Российская Федерация

Цель настоящего исследования заключалась в оценке взаимосвязи между аллельными вариантами генов глутатион-S-трансфераз и частотой патологических форм эритроцитов периферической крови у рабочих, длительное время профессионально подвергающихся воздействию соединений ртути, и у жителей с. Акташ (Республика Алтай), не связанных с работой на производстве (контроль). Установлено, что рабочие предприятия по производству и утилизации ртути, имеющие в своем генотипе мутантные (нулевые) аллели гена *GSTM1*, показали высокий уровень некоторых типов анизоцитов, как по сравнению с лицами носителями активного варианта этого гена, так и по сравнению с контролем (P<0,01). Кроме того, у рабочих с нулевыми аллелями по генам *GSTM1* и *GSTT1* по сравнению с контролем и лицами, имеющими активный генотип *GSTM1(+) / GSTT1(+)*, наблюдалось существенное возрастание частоты пойкилоцитов, в особенности макроцитарных форм, а также эритроцитов с микроядрами (P<0,01). Увеличение числа микроцитов было отмечено только у рабочих с «двойной» делеционным генотипом *GSTM1(0) / GSTT1(0)*. Анализ показателей у контрольной группы показывает, что у лиц, имеющих «двойной» нулевой гомозиготный генотип, также как и в группе рабочих, число эритроцитов с микроядрами было значимо выше, чем у лиц с генотипом *GSTM1*(+) / *GSTT1(+)*.

Ключевые слова: *полиморфизм генов, глутатион-S-трансфераза, GSTM1, GSTT1, рабочие, производство ртути, патологические формы эритроцитов.*

Введение. На территории Республики Алтай имеются биогеохимические провинции с высоким содержанием ртути близи с. Акташ [1]. В настоящее время ГУП «Акташское Горнометаллургическое предприятие» (АГП) является единственным в России предприятием, где производят металлическую ртуть. Ртуть представляет собой токсичный металл, поражающий различные органы и системы организма человека, а также вызывающий гено- и цитотоксические эффекты, в особенности у людей, употребляющих в пищу рыбу, проживающих на загрязненной территории или у работников ртутных производств [2,3]. В настоящее время, доказано, что как неорганическая ртуть, так и метилртуть способны взаимодействовать с глутатионом, через реакцию катализируемую глутатион-S-трансферазами [4]. Поэтому у лиц, подвергшихся воздей-

Ильинских Николай Николаевич (Ilyinskikh Nikolai Nikolaevich), заведующий кафедрой биологии и генетики, доктор биологических наук ГБОУ ВПО СибГМУ профессор кафедры экологии и экологического менеджмента, ФГАОУВО НИТГУ, 634050, г. Томск, Российская Федерация, nauka-tomsk@yandex.ru
Ильинских Екатерина Николаевна (Ilyinskikh Ekaterina Nikolaevna), профессор кафедры инфекционных болезней и эпидемиологии, доктор медицинских наук ГБОУ ВПО СибГМУ, профессор кафедры геохимии и геоэкологии ФГАОУВО НИТПУ, 634050, г. Томск, Российская Федерация, ilyinskikh@yandex.ru
Ильинских Ирина Николаевна (Ilyinskikh Irina Nikolaevna), профессор кафедры микробиологии и вирусологии, доктор биологических наук ГБОУ ВПО СибГМУ, 634050, г. Томск, Российская Федерация, ilyinskikh@yandex.ru
Гвоздарева Ольга Владимировна (Gvozdareva Olga Vladimirovna), аспирант ГБОУ ВПО СибГМУ, 634050, г. Томск, Российская Федерация, sbornik-tomsk@mail.ru

Исследование проведено при поддержке грантов РГНФ № 15-06-10190 и № 13-06-00709.

ствию ртути, и имеющих делеционные варианты генов *GSTM1* и *GSTT1* происходит замедление процессов элиминации ртути, повышение её биоаккумуляции и индукции оксидативного стресса [4].

Цель настоящего исследования заключалась в оценке связи между полиморфизмом генов глутатион-S-трансфераз и частотой патологических форм эритроцитов периферической крови у рабочих, длительное время профессионально подвергающихся воздействию соединений ртути, и у жителей с. Акташ (Улаганский район, Республика Алтай), не связанных с работой на производстве (контроль).

Материалы и методы исследования. Проведено обследование 184 человек мужского пола в возрасте от 24 до 48 лет (32,5±10,2 лет), занятых выполнением современных видов механизированного физического труда на ГУП «АГП». В качестве контроля в тот же период времени проведено обследование 156 мужского населения с. Акташ (Улаганский район, Республика Алтай) в возрасте 34,2±9,5 лет, непосредственно не связанных с процессом производства или утилизации ртути. В настоящее исследование были включены только те лица, которые подписали добровольное информированное согласие относительно взятия у них 10 мл венозной крови с целью изготовления препаратов для анализа патологических форм эритроцитов и определения полиморфизма генов биотрансформации ксенобиотиков *GSTM1* и *GSTT1.* Каждый участник ответил на вопросы анкеты, касающиеся, возраста, этнической принадлежности, профессионального маршрута, пристрастия к курению, алкоголю, предпочтений в питании, употребления в пищу местной речной рыбы, наличия заболеваний и места жительства. Исследование проводилось в соответствии со стандартами Хельсинской декларации 1975 г и её пересмотру 1983 г. Все обследованные лица были рандомизированы. Группы были сопоставимы по возрасту, этнической принадлежности (преимущественно славянских национальностей и коренной народности алтайцев), образованию, пристрастию к курению, алкоголю, а также по употреблению в пищу местной речной рыбы. Критериями включения потенциальных участников в исследование были мужской пол, возраст от 25 до 55 лет, стаж работы на предприятии (для группы рабочих) не менее одного года, а критериями исключения – возраст 56 лет и более, работа на других вредных и опасных производствах в анамнезе.

Делеционные варианты генов *GSTM1* (GenBank № X68676) и *GSTT1* (GenBank № AP000351) были идентифицированы с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) [5]. ДНК выделяли из образцов периферической крови, хранившихся при температуре -20 °С, согласно стандартному протоколу. В амплификационную пробу вносили две пары праймеров, что давало возможность одновременно амплифицировать фрагменты каждого из указанных генов. В данной работе использовали амплификаторы «Терцик» («ДНК-Технология», РФ). Разделение продуктов амплификации и продуктов рестрикции ампликонов проводили с помощью электрофореза в горизонтальном 3% агарозном геле, приготовленном на однократном трис-боратном буфере (89мМ Трис, 89 мМ борная кислота и 2 мМ ЭДТА) с добавлением бромистого этидия и визуализацией в проходящем ультрафиолетовом свете (длина волны 380 нм). Нормальные аллели генов, обозначенные знаком «+», характеризуются присутствием ПЦР-продуктов для генов *GSTM1(+)* или *GSTT1(+),* что свидетельствует о том, что данный донор либо гетерозиготен, либо гомозиготен по отсутствию делеции в указанных генах. В то же время, генотип *GSTM1(0)* или *GSTT1(0)* означает отсутствие на электрофореграмме фрагментов размером 215 и 480 пар оснований, что говорит о том, что данный индивидуум гомозиготен по делециям этих генов.

Анализ эритроцитов проводили в стандартных гематологических мазках, окрашенных по методу Романовского-Гимзе. Учитывали патологические формы эритроцитов согласно общепринятой классификации [6]. Размеры эритроцитов регистрировали при помощи эритроцитометрии с использованием окулярного микрометра. Кроме того, проведена оценка частоты эритроцитов с микроядрами в соответствии с критериям, изложенным нами ранее [7]. Основное внимание при определении истинности наблюдаемого микроядра связано с размерностью, формой, положением, структурой и окраской этих образований, что обусловлено с возможными артефактами, в основном, связанными с отложениями красителя У каждого обследованного изучено не менее 10000 эритроцитов.

Статистическую обработку осуществляли с использованием пакетов статистических программ «*Statistica 6.0*» и «*Microsoft Office Excel 2007*» [8]. Проверка нормальности распределения при помощи критерия Колмогорова-Смирнова не выявила его отличий от нормального. Все количественные показатели исследования обрабатывали с применением *t*-критерия Стьюдента для независимых выборок. Различия сравниваемых результатов ($\bar{X}\pm m$, где $\bar{X}$– выборочное среднее арифметическое, m – ошибка среднего арифметического) считались достоверными при достигнутом уровне значимости $P<0,05$.

Результаты и обсуждение. Результаты анализа частоты анизоцитоза эритроцитов приведены в таблице 1. В крови рабочих с «двойным» нуле-

вым генотипом *GSTM1(0) / GSTT1(0)* было установлено статистически значимое увеличение таких патологических форм эритроцитов как акантоциты, стоматоциты, дакриоциты, дрепаноциты и дегенеративные формы, как по сравнению с соответствующим контролем (P<0,01), так и по сравнению с рабочими-носителями комбинации функционально активных вариантов генов *GSTM1(+) / GSTT1(+)* (P<0,01). При этом уровень эхиноцитов был сопоставим с соответствующими значениями в контрольной группе (*P*>0,05). Аналогичное повышение частоты различных форм анизоцитов по сравнению с контролем отмечено в смешанном варианте генотипа с делеционным геном *GSTM1(0)* (*P*<0,01), но не *GSTT1(0)* (*P*>0,05).

Особо следует отметить, что у рабочих, в генотипе которых присутствовали делеционные варианты генов *GSTM1(0)* или/и *GSTT1(0),* по сравнению с группой рабочих, имеющих комбинацию активных вариантов генов *GSTM1(+) / GSTT1(+)* или по сравнению с соответствующим контролем, в периферической крови существенно увеличивалась частота некоторых типов пойкилоцитов: макроовалоцитов, макроцитов и мегалоцитов (*P*<0,01) (табл. 2). В результате анализа уровней микроцитов и микроовалоцитов достоверные отличия между группами контроля и рабочих были зарегистрировано только у «двойных» нулевых гомозигот *GSTM1(0) / GSTT1(0)* (*P*<0,01). Аналогичных достоверных отличий между лицами с различными комбинациями генов *GSTM1* и *GSTT1* в контрольной группе обнаружено не было.

Результаты микроядерного теста позволяют заключить, что уровень эритроцитов с микроядрами в группе рабочих во всех случаях был значительно выше, чем в контроле (*P*<0,01). В то же время в группе рабочих с «двойным» нулевым генотипом *GSTM1(0) / GSTT1(0)* число таких клеток было в 7,3 раза больше соответствующих значений, наблюдаемых у лиц с генотипом *GSTM1(+) / GSTT1(+)* (*P*<0,01). Вместе с тем, также как и у рабочих, в контрольной группе, имеющей «двойной» нулевой гомозиготным генотип, число эритроцитов с микроядрами было существенно выше, чем у лиц с активными вариантами генов *GSTM1(+) / GSTT1(+)* (0,09±0,02‰ против 0,03±0,01‰, *P*<0,01).

Известно, что в экспериментах в условиях *in vi-*

Таблица 1

Частота анизоцитов периферической крови рабочих, занятых в производстве и утилизации ртути и в контрольной группе, в зависимости от наличия у обследованных лиц различных сочетаний вариантов генов GSTM1 и GSTT1 ($\bar{X}$± m)

Частота анизоцитов и число дегенеративных форм эритроцитов, ‰	Сочетания активных (+) или неактивных (0) вариантов генотипов GSTM1 / GSTT1 у рабочих и контроля			
	+/+	+/0	0/+	0/0
	n=41 (34)	n=46 (33)	n=39 (36)	n=58 (53)
Акантоцит	0,71±0,22^ (0,33±0,11)^	1,54±0,43^ (0,62±0,10)^	3,51±0,52^* (0,54±0,12)^	6,32±0,45* (1,80±0,09)
Эхиноцит	0,70±0,23 (0,62±0,06)	0,72±0,56 (0,48±0,05)	0,72±0,39 (0,57±0,04)	1,86±0,67 (0,56±0,08)
Стоматоцит	0,57±0,17^ (0,46±0,08)	0,56±0,24^ (0,53±0,09)	1,53±0,14* (0,58±0,11)	2,12±0,45* (0,64±0,09)
Дакриоцит	0,12±0,01^ (0,09±0,01)	0,15±0,12^ (0,12±0,02)	1,30±0,12^* (0,14±0,02)	2,37±0,18* (0,23±0,01)
Дрепаноцит	0,08±0,03^ (0,02±0,01)	0,12±0,04 (0,03±0,01)	0,17±0,02* (0,02±0,02)	0,19±0,04* (0,03±0,02)
Дегенеративные формы	0,08±0,03^ (0,02±0,01)	0,08±0,05^ (0,01±0,01)	1,08±0,05^* (0,03±0,02)	3,32±0,07* (0,08±0,02)

Примечание для табл. 1 и 2: все значения для контроля приведены в скобках; значимые отличия показателей отмечены знаками: «*» (*P*<0,01) в группе рабочих от контроля; «^» (*P*<0,01) у лиц с двойным активным *(+/+)* или смешанным (+/0 или 0/+) вариантами генотипа *GSTM1 / GSTT1* от показателей у лиц с двойным нулевым генотипом *GSTM1 / GSTT1 (0/0)*.

Таблица 2

Частота пойкилоцитов и число эритроцитов с микроядрами в периферической крови рабочих, занятых в производстве и утилизации ртути и в контрольной группе, в зависимости от наличия у обследованных лиц различных сочетаний вариантов генов GSTM1 и GSTT1 ($\bar{X}$± m)

Частота пойкилоцитов и число эритроцитов с микроядрами, ‰	Сочетания активных (+) или неактивных (0) вариантов генотипов GSTM1 / GSTT1 у рабочих и контроля			
	+/+	+/0	0/+	0/0
	n=41 (34)	n=46 (33)	n=39 (36)	n=58 (53)
Микро-овалоцит	3,32±0,54^ (3,17±0,52)	6,28±0,82 (4,38±0,56)	7,93±2,22 (4,64±0,54)	8,45±0,72* (5,32±0,61)
Макро-овалоцит	2,55±0,25^ (1,45±0,25)	7,12±0,65^* (1,52±0,17)	7,36±0,85^* (1,00±0,28)	12,41±0,75* (3,56±0,71)
Микроцит	6,10±2,02^ (3,00±1,34)	8,20±3,20^ (4,84±1,56)	8,18±1,18^ (4,11±1,54)	16,33±3,44* (5,75±1,44)
Макроцит	6,23±2,28^ (2,34±1,58)	18,52±3,87* (3,14±1,34)	16,42±2,87* (3,12±1,45)	17,22±2,87* (3,08±1,23)
Мегалоцит	0,10±0,04^ (0,07±0,03)	7,18±0,09* (0,06±0,02)	8,24±0,08* (0,11±0,01)	10,23±0,79* (0,22±0,04)
Эритроцит с микроядром	0,08±0,02^ (0,03±0,01)^	0,25±0,04^* (0,05±0,01)	0,26±0,05^* (0,04±0,01)	0,58±0,06* (0,09±0,02)
Всех типов патологических форм эритроцитов, ‰	21,18±3,51^* (11,78±3,22)	50,19±6,65^* (14,96±4,84)	56,32±6,63^* (14,62±4,82)	82,08±8,44* (20,72±6,65)

tro было доказано, что метилртуть и неорганическая ртуть, взаимодействуя с сульфгидрильными группами тубулина, вызывают амплификацию центросом и/или ингибирование сборки микротрубочек, что сопровождается появлением множественных полюсов деления, полиплоидных клеток, неравномерной сегрегации хромосом в дочерних клетках, анеуплоидии и микроядер [9, 10]. В связи с этим можно предположить, что механизм образования выявленных нами в группе рабочих патологических форм эритроцитов связан с формированием в процессе эритропоэза под влиянием ртути полиплоидных клеток, которые в дальнейшем после энуклеации превращаются в макроциты и мегалоциты, а отставшие хромосомы образуют микроядра [7].

Другим важным механизмом токсических и генотоксических эффектов ртути является активация образования свободных радикалов и оксидативного стресса [11], что может приводить к повреждению эритроцитов и истощению содержания глутатиона в этих клетках. Установлено, что сочетание нулевых гомозиготных генотипов *GSTT1* и *GSTM1* было ассоциировано с повышенным уровнем содержания ртути в образцах волос и крови [4,11]. Поэтому выявленное нами статистически значимое повышение уровней патологических форм эритроцитов у рабочих, имеющих неактивный вариант гена GSTM1, может быть связано с повышенной аккумуляцией этого тяжелого металла в организме этой группы людей. Установлено, что в рационе обследованных нами жителей с. Акташ (рабочих и контроля) присутствует рыба, отловленная в реке Ярлыамры, в донных осадках которой концентрации ртути составляют 532-683 мг/кг, что может играть роль дополнительного фактора, способствующего повышенной биоаккумуляции ртути не только среди рабочих, но и среди многих местных жителей, не контактирующих с этим тяжелым металлом профессионально [1].

Заключение. Таким образом, настоящее исследование свидетельствует о том, что у местных жителей, проживающих на загрязненной ртутью территории (с. Акташ, Улаганский район, Республика Алтай), имеющих «двойной» нулевой генотип GSTM1(0)/GSTT1(0), установлен статистически значимый повышенный уровень патологических форм эритроцитов в периферической крови. Наиболее высокие показатели патологических форм эритроцитов выявлены в группе рабочих, имеющих «двойной» делетированный генотип, которые были профессионально связаны с производством ртути.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Робертус Ю. В., Пузанов А. В., Любимов Р. В., Архипов И. А.* Экогеохимия ртути в природных средах и техногенных объектах района Акташского ГМП (Республика Алтай). //Мир науки, культуры, образования. 2010; (2): 280-2.
2. Crespo-López M.E., Macêdo G.L., Arrifano G.P., Pinheiro Mda C., do Nascimento J.L., Herculano A.M. Genotoxicity of mercury: contributing for the analysis of Amazonian populations. //Environ. Int. 2011; 37(1):136-41.
3. *Soto-Ríos M.L., Rothenberg S., Gonsebatt M.E., Talavera-Mendoza O.* Cytogenotoxicity in uroepithelial cells of women exposed to mercury in a mining area. //Occup. Environ. Med. 2010; 67(9):620-4.
4. *Gundacker C., Komarnicki G., Jagiello P., Gencikova A., Dahmen N., Wittmann K.J.* et al. Glutathione-S-transferase polymorphism, metallothionein expression, and mercury levels among students in Austria. //Sci. Total. Environ. 2007; 385(1-3):37-47
5. *Abdel-Rahman S.Z., El-Zein R.A., Anwar W.A., Au W.W.* A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of GSTM1 and GSTT1 genes in population studies. //Cancer. Lett. 1996; 107(2): 229-33.
6. *Walker H.K., Hall W.D., Hurst J.W.,* eds. Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations. 3rd ed. Boston: Butterworths; 1990.
7. *Ильинских Н. Н., Ксенц А. С., Ильинских Е. Н.* Микроядерный анализ в оценке цитогенетической нестабильности. Томск: ТГПУ; 2011.
8. *Боровиков В. П., Боровиков И. П.* Статистический анализ и обработка данных в среде «Windows». М: Филинъ; 1997.
9. *Ochi T.* Methylmercury, but not inorganic mercury, causes abnormality of centrosome integrity (multiple foci of gamma-tubulin), multipolar spindles and multinucleated cells without microtubule disruption in cultured Chinese hamster V79 cells.// Toxicology. 2002; 175(1-3):111-21.
10. *Bonacker D., Stoiber T., Wang M., Böhm K.J., Prots I., Unger E.* et al. Genotoxicity of inorganic mercury salts based on disturbed microtubule function. Arch Toxicol. 2004; 78(10):575-83.
11. *Lee B.*-E., Hong Y.-C., Park H., Ha M., Koo B.S., Chang N. et al. Interaction between GSTM1/GSTT1 Polymorphism and Blood Mercury on Birth Weight. // Environmental Health Perspectives. 2010; 118(3):437-43.

REFERENCES:

1. *Robertus Ju.V., Puzanov A.V., Ljubimov R.V., Arhipov I.A.* Ecogeochemistry of mercury in the environment and technogenetics objects near the Aktash mining and smelting enterprise.// Mir nauki, kul'tury, obrazovanija. 2010; (2):280-2 (in Russian).
2. *Crespo-López M.E., Macêdo G.L., Arrifano G.P., Pinheiro Mda C., do Nascimento J.L., Herculano A.M.* Genotoxicity of mercury: contributing for the analysis of Amazonian populations. //Environ. Int. 2011; 37(1):136-41.
3. *Soto-Ríos M.L., Rothenberg S., Gonsebatt M.E., Talavera-Mendoza O.* Cytogenotoxicity in uroepithelial cells of women exposed to mercury in a mining area.// Occup. Environ. Med. 2010; 67(9):620-4.
4. *Gundacker C., Komarnicki G., Jagiello P., Gencikova A., Dahmen N., Wittmann K.J.* et al. Glutathione-S-transferase polymorphism, metallothionein expression, and mercury levels among students in Austria.// Sci. Total. Environ. 2007; 385(1-3):37-47
5. *Abdel-Rahman S.Z.,* el-Zein R.A., Anwar W.A., Au W.W. A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of GSTM1 and GSTT1 genes in population studies. // Cancer. Lett. 1996; 107(2): 229-33.
6. *Walker H.K., Hall W.D., Hurst J.W.,* eds. Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations. 3rd ed. Boston: Butterworths; 1990.
7. *Ilyinskikh N.N., Ksenc A.S., Ilyinskikh E.N.* Micronuclei analysis in the assessment of cytogenetic instability. Tomsk: TGPU; 2011 (in Russian).
8. *Borovikov V.P., Borovikov I.P.* Statistic analysis and the data processing in the environment of «Windows». M: Filin; 1997 (in Russian).
9. *Ochi T.* Methylmercury, but not inorganic mercury, causes abnormality of centrosome integrity (multiple foci of gamma-tubulin), multipolar spindles and multinucleated cells without microtubule disruption in cultured Chinese hamster V79 cells.// Toxicology. 2002; 175(1-3):111-21.
10. *Bonacker D., Stoiber T., Wang M., Böhm K.J., Prots I., Unger E.* et al. Genotoxicity of inorganic mercury salts based on disturbed microtubule function. Arch Toxicol. 2004; 78(10):575-83.
11. *Lee B.*-E., Hong Y.-C., Park H., Ha M., Koo B.S., Chang N. et al. Interaction between GSTM1/GSTT1 Polymorphism and Blood Mercury on Birth Weight. // Environmental Health Perspectives. 2010; 118(3):437-43.

N.N. Ilyinskikh[1,3], E.N. Ilyinskikh[1,2], I.N. Ilyinskikh[1], O.V. Gvozdareva[1]

CYTOPATHOLOGY OF PERIPHERAL BLOOD ERYTHROCYTES AND POLYMORPHISM OF GLUTATIONE-S-TRANSFERASE GENES IN WORKERS OF MERCURY PRODUCING AND RECYCLING INDUSTRY

[1]State Budgetary Educational Institution of Higher Professional Education «Siberian State Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 634050 Tomsk, Russian Federation
[2]Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education «National Research Tomsk Polytechnic University» of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation, 634050, Tomsk, Russian Federation
[3]Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education «National Research Tomsk State University» of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation, 634050, Tomsk, Russian Federation

The aim of this study was to evaluate the association between glutathione-S-transferase (GST) genes polymorphism and the frequency of cytopathology of peripheral blood erythrocytes in the workers occupationally exposed to mercury as well as in the occupationally non-exposed local population of the Aktash settlement of the Republic Altai (control group). It was found that the workers of the mercury producing and recycling enterprise with deletion (null)-variant GSTM1 genes showed significantly higher levels of anisocytosis in the peripheral blood than both the *GSTM1* positive individuals and the control group (P<0,01). In addition, the null variants of both *GSTM1* and *GSTT1* genes in workers were significantly associated with the elevated frequency of poikilocytosis, particularly macrocytosis, and micronucleated erythrocytes in the peripheral blood as compared to the controls and the active genotype *GSTM1(+) / GSTT1(+)* (P<0,01). Moreover, the increased level of microcytosis was detected exclusively in workers with the combination of null variants of *GSTT1(o)* and *GSTM1(o)* genes. Analysis of the data of the control group as well as the workers exposed to mercury, demonstrated that in the individuals with the combination of null variants of *GSTT1* and *GSTM1* genes, the frequency of micronucleated erythrocytes was significantly higher than in the ones with active genotypes of *GSTM1(+) / GSTT1(+)*.

Keywords: *gene polymorphism, glutathione-S-transferase, GSTM1, GSTT1, workers, mercury industry, pathological forms of erythrocytes.*

Переработанный материал поступил в редакцию 07.10.2015 г.

УДК 57.04 :575.8

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ АТРОПИНА НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ ACHE И BCHE ПРИ ОТРАВЛЕНИИ КРЫС МАЛАТИОНОМ

А.В. Бабкин[1], И.С. Бердинских[1], Н.С. Осечкина[2], Г.В. Назаров[1], М.А. Юдин[1], В.Н. Быков[1]

[1]Научно-исследовательский испытательный институт (военной медицины) Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова Министерства обороны Российской Федерации, 195043, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация
[2]Федеральное государственное учреждение науки «Институт Токсикологии» Федерального медико-биологического агентства России, 192019, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

На модели отравления крыс малатионом в дозе 1 $ЛД_{50}$ охарактеризована экспрессия генов *Ache* и *Bche* в образцах тканей на фоне лечения атропином. Отравление малатионом вызывает достоверное снижение относительного уровня экспрессии генов *Ache* и *Bche* в головном мозге и печени. Уменьшение экспрессии исследованных генов составило более 50 % и сохранялось на этом уровне в течение 14 суток. Установлено, что лечение атропином оказывает протективное действие к снижению уровня экспрессии в головном мозге. Полученные данные указывают на взаимосвязь эффективности лечения с показателями экспрессии изучаемых генов.

Ключевые слова: *экспрессия гена, ген Ache, ген Bche, малатион, атропин.*

Введение. До настоящего времени оценка активности холинэстеразы (ХЭ) остается наиболее точным критерием диагностики поражения фосфорорганическими соединениями (ФОС) по степени тяжести, а также показателем адекватности проведения терапии. Малатион используется в качестве модельного ФОС при экспериментальном исследовании динамики развития интоксикации и эффективности проводимой терапии [1].

Показано, что различный эстеразный статус определяет устойчивость организма к воздействию ФОС и, в том числе малатиона [2]. Так значительная активность бутирилхолинэстеразы (БХЭ) в плазме крови мышей обусловливает более высокую резистентность животных данного вида к отравлению ФОС, по сравнению с крысами [3]. Несоответствие профиля ферментативной активности у обезьян и человека завышает параметры защитной эффективности и лечебного эффекта препаратов при экстраполяции результатов на человека [4].

С угнетением ацетилхолинэстеразы (АХЭ) связывают нарушения нервно-мышечной передачи и развитие холинопозитивной симптоматики при поражении ФОС. В тоже время первичный контакт токсиканта при попадании в организм происходит с БХЭ плазмы крови [5]. Данное обстоятельство указывает на необходимость исследования активности обоих ферментов при диагностике отравлений ФОС.

Помимо эстеразного статуса, устойчивость к воздействию ФОС может быть обусловлена уровнем экспрессии целевых генов в постинтоксикационном периоде отравлений. Известно, что ферментативная активность ХЭ определяется молекулярно-генетическими особенностями, в том числе уровнем экспрессии генов *Ache* и *Bche*, кодирующих АХЭ (шифр фермента КФ 3.1.1.7) и БХЭ (шифр фермента КФ 3.1.1.8). Анализ информационных источников показал, что к настоящему времени недостаточно полно рассмотрена динамика изменения экспрессии генов *Ache* и *Bche*

Бабкин Александр Владимирович (Babkin Aleksandr Vladimirovich), научный сотрудник НИИИ ВМ ВМедА им. С.М. Кирова Министерства обороны Российской Федерации, 195043, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация, babkinnik@yandex.ru
Бердинских Ирина Сергеевна (Berdinskih Irina Sergeevna), научный сотрудник НИИИ ВМ ВМедА им. С.М. Кирова Министерства обороны Российской Федерации, 195043, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация , irina_berdinskih@mail.ru.
Осечкина Наталья Сергеевна (Osechkina Natalya Sergeevna), научный сотрудник ФГУН «Институт Токсикологии» ФМБА России, 192019, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация, 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, Российская Федерация, denis-100@list.ru.
Юдин Михаил Анатольевич (Yudin Mikhail Anatol'evich), кандидат медицинских наук, доцент, заместитель начальника отдела НИИИ (ВМ) ВМедА им. С.М. Кирова, 195043, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация, mikhail.judin@gmail.com.
Быков Владимир Николаевич (Bykov Vladimir Nikolaevich), доктор медицинских наук, профессор, начальник НИИЦ (МБЗ) НИИИ (ВМ) ВМедА им. С.М. Кирова, 195043, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация, bykov_imm@yahoo.com.

на экспериментальных моделях отравления животных некоторыми ФОС [6, 7, 8]. Также отсутствует информация о характере влияния малатиона на уровень экспрессии генов *Ache* и *Bche* в постинтоксикационном периоде, остаются не исследованными особенности экспрессии рассматриваемых генов на фоне терапии.

Цель данного исследования – изучение влияния атропина на экспрессию генов *Ache* и *Bche* в образцах тканей крыс на фоне отравления малатионом.

Материалы и методы исследования. Эксперименты выполнены в соответствии с «Правилами лабораторной практики» (Приказ Минздравсоцразвития России от 23 августа 2010 г № 708 н) на белых нелинейных крысах-самцах массой 180-240 г, содержавшихся в условиях вивария (питомник «Рапполово», Ленинградская область). За 12 ч до начала эксперимента животных лишали доступа к пище. Для моделирования отравления животным однократно внутрижелудочно (в/ж) вводили малатион в дозе 1 $ЛД_{50}$ (410 мг/кг). В качестве антидота отравлений ФОС животным вводили атропин в дозе 2 мг/кг [9]. Животным без лечения вводили стерильную воду для инъекций из расчета 1 мл/кг. Наблюдение за животными согласно «Руководства…» осуществляли в течение 14 суток [9].

Тотальную РНК для анализа экспрессии выделяли из образцов головного мозга, печени и крови крыс с использованием автоматической станции «NorDiag Arrow» (Швеция). Выделенную РНК переводили в кДНК по протоколу High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems (США).

Экспрессию генов *Ache* и *Bche* в образцах тканей крыс оценивали через 1, 7 и 14 суток после введения малатиона в дозе 1 $ЛД_{50}$ методом ПЦР-РВ, по отношению к гену-рефери *18s-rRNA* на амплификаторе «7900HT Fast Real-Time PCR System», Applied Biosystems (США), с использованием тест-систем Applied Biosystems (Rn00596883_m1 и Rn00576087_m1). Термоциклирование осуществляли по следующей программе: 50°С – 120 секунд – 1 цикл; 95°С – 600 секунд – 1 цикл; (95°С – 15 секунд, 60°С – 60 секунд) – 45 циклов.

Относительный уровень экспрессии генов (УЭ, %) определяли по формуле [10]:

УЭ = количество мРНК определяемого гена / количество мРНК гена *18s-rRNA* ×100%

Статистическую обработку результатов производили в программе Statistica 8.0 с использованием критерия Крускала-Уоллиса.

Результаты и обсуждение. В результате проведенных исследований у всех экспериментальных животных не было выявлено экспрессии генов *Ache* и *Bche* в образцах крови, в то же время установлен значимый уровень экспрессии указанных генов в образцах головного мозга и печени.

УЭ генов *Ache* и *Bche* в головном мозге крыс до (интактные) и через 1, 7 и 14 суток после отравления малатионом в дозе 1 $ЛД_{50}$ (с лечением атропином (опыт) и без лечения (контроль)) показаны на рисунке 1.

Анализ результатов (рис. 1, *а*) показал, что у животных контрольной группы через 1, 7 и 14 суток после отравления малатионом в дозе 1 $ЛД_{50}$ выявлено достоверное снижение УЭ гена *Ache* в головном мозге.

У крыс, получавших лечение атропином 2 мг/кг, изменения УЭ гена *Ache* через 1, 7 и 14 суток после отравления малатионом достоверно ($p<0,05$) не отличались от интактной группы.

Установлено, что УЭ гена *Bche* в головном мозге интактных крыс превышает показатель экспрессии гена *Ache* в 2,8 раза. По этому показателю характерен широкий разброс внутри одной популяции крыс (рис.1, *б*).

При исследовании УЭ гена *Bche* в головном мозге крыс выявлено достоверное снижение ее в среднем в 1,5-2 раза после отравления малатионом в дозе 1 $ЛД_{50}$. В этой группе снижение уровня экспрессии прослеживалось на протяжении всего срока наблюдения.

Применение атропина оказывало положительное влияние на УЭ *Bche* в головном мозге. Несмотря на существенное снижение показателя через 1 сутки после отравления малатионом в дальнейшие сроки отмечали восстановление экспрессии (7 сутки) и ее рост в 1,5 раза (14 сутки) по сравнению с интактными животными. Через 14 суток после начала эксперимента экспрессия *Bche* в головном мозге на фоне введения атропина была достоверно ($p<0,05$) выше, чем у не леченных животных.

УЭ генов *Ache* и *Bche* в печени крыс до (интактные) и через 1, 7 и 14 суток после отравления малатионом в дозе 1 $ЛД_{50}$ (с лечением атропином (опыт) и без лечения (контроль)) показаны на рисунке 2.

У крыс через 1, 7 и 14 суток после отравления малатионом в дозе 1 $ЛД_{50,}$ независимо от того вводился атропин или нет, выявляли достоверное снижение УЭ гена *Ache* в печени (рис. 2, *а*). Уменьшение уровня экспрессии данного гена в печени составило около 50 % и сохранялось на протяжении всего срока регистрации показателей.

Схожие результаты наблюдались и при анализе экспрессии гена *Bche* в печени крыс (рис. 2, *б*). Установлено, что у крыс контрольной группы (без лечения атропином) через 1, 7 и 14 сутки после введения малатиона в дозе 1 $ЛД_{50}$ выявляли статистически значимое снижение УЭ гена *Bche* в печени. Уменьшение УЭ данного гена составило более 70 % и сохранялось на протяжении все-

го срока регистрации показателей. Применение атропина компенсировало снижение УЭ гена *Bche* в печени через 1 сутки после введения токсиканта. Через 7 и 14 суток после введения малатиона у опытных животных также выявляли снижение УЭ гена *Bche*.

Из результатов настоящего исследования можно заключить, что у животных после отравления малатионом выявлено достоверное снижение УЭ гена *Ache* и *Bche* в головном мозге и печени. Максимум снижения в 3 раза отмечен по окончании 1 суток интоксикации для экспрессии гена *Ache*. В отношении экспрессии гена *Bche* снижение относительно интакных значений составило 1,5-2 раза. Установлено, что УЭ гена *Bche* интактных крыс превышает показатель экспрессии гена *Ache* около 3 раз. Снижение экспрессии указанных выше генов при отравлении малатионом, вероятно, может объясняться его влиянием на транскрипционный аппарат клетки, функциональная активность которого в печени выше, чем в других органах [11, 12]. Малатион, действуя как «негативный» регулятор транскрипции генов *Ache* и *Bche*, может приводить к терминации данного процесса и, как следствие, к снижению уровня мРНК.

На фоне терапии атропином 2 мг/кг изменения экспрессии генов *Ache* и *Bche* в головном мозге крыс через 1, 7 и 14 суток после отравления малатионом от интактной группы достоверно не от-

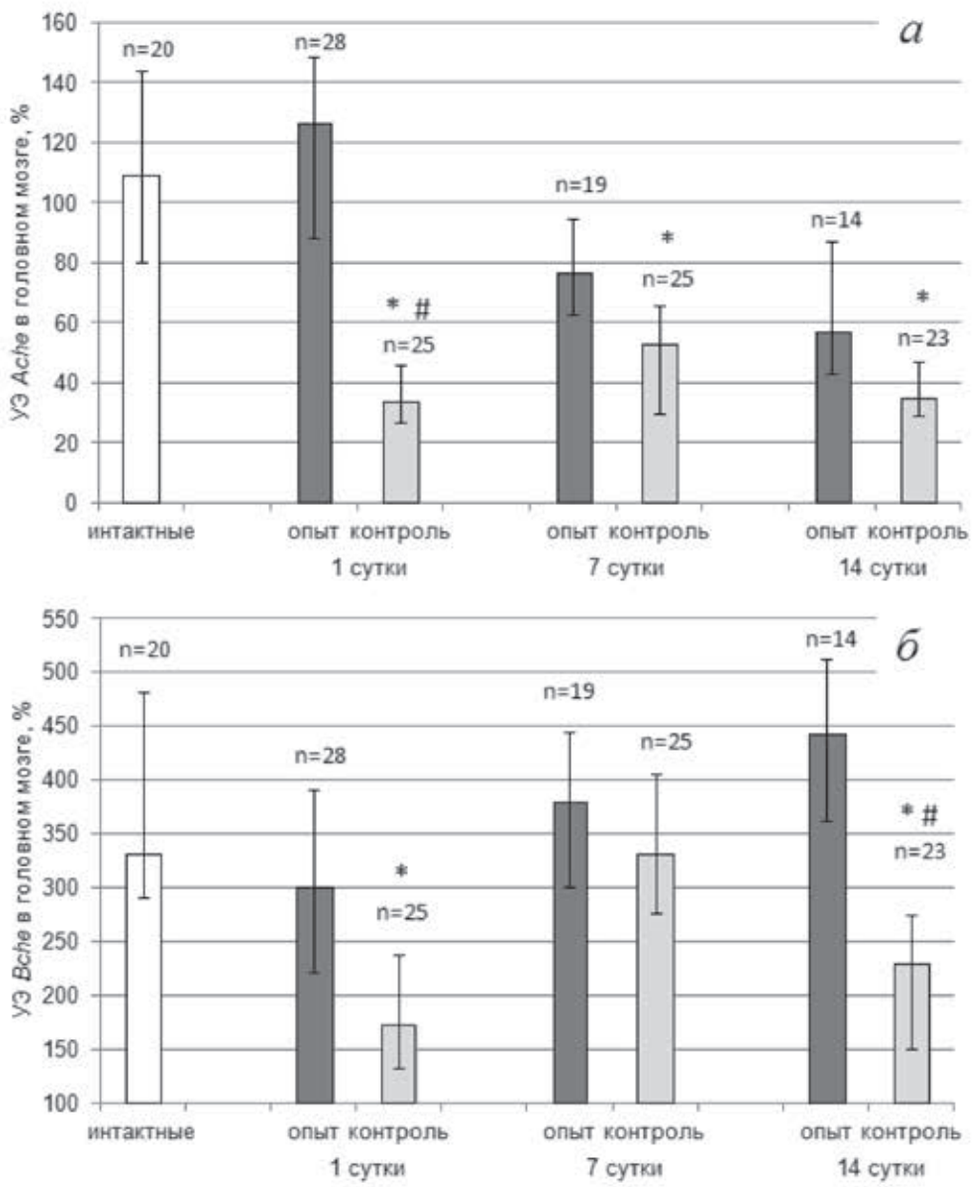


Рис. 1 - Относительный уровень экспрессии генов *Ache* (*а*) и *Bche* (*б*) в головном мозге крыс после применения атропина на фоне отравления малатионом, Медиана (25; 75 перцентиль)
Примечание: * - значимое (p<0,05) различие с группой «интактные»; # - значимое (p<0,05) различие групп: «опыт» и «контроль»; n – количество животных в группе

личались. Атропин не влиял на уровень экспрессии гена *Ache* в печени. Уменьшение УЭ данного гена составило до 70 % и сохранялось на этом уровне на протяжении всего срока регистрации показателей. Схожие результаты наблюдались и при анализе экспрессии гена *Bche* в печени крыс. Однако применение атропина компенсировало снижение УЭ гена *Bche* в печени только через 1 сутки после введения токсиканта. Через 7 и 14 суток после введения малатиона у опытных животных наблюдалось снижение УЭ гена *Bche*. Выявленная закономерность может объясняться «позитивным» влиянием атропина на регуляторные элементы генов *Ache* и *Bche* (промоторы, энхансеры) и факторы транскрипции, которые инициируют процесс транскрипции и приводит к наработке и увеличению мРНК в клетке [13].

Полученные данные указывают на способность атропина предупреждать резкое снижение экспрессии генов *Ache* и *Bche* в головном мозге в острый период отравления и указывают на целесообразность учета УЭ при разработке перспективных средств терапии отравлений ФОС. Вместе с тем, знания об уровне экспрессии генов *Ache* и *Bche* могут быть использованы при определении критериев оценки эффективности терапии и построения прогноза исхода интоксикации.

Заключение. Таким образом, в результате проведенного исследования изучено влияние атропина на уровень экспрессии генов *Ache* и *Bche* на

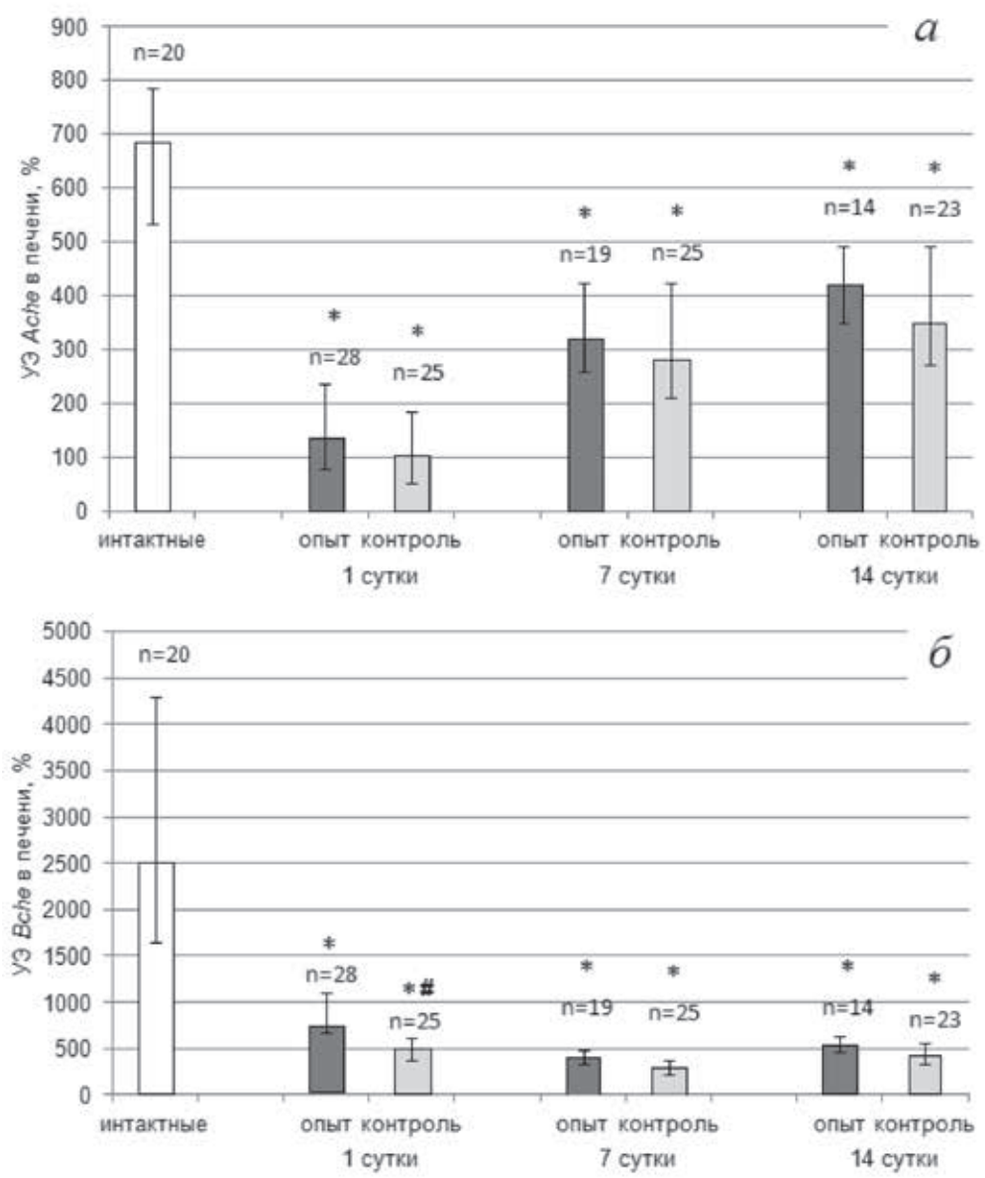


Рис. 2 - Относительный уровень экспрессии генов *Ache* (*а*) и *Bche* (*б*) в печени крыс после применения атропина на фоне отравления малатионом, Медиана (25; 75 перцентиль)
Примечание: * - значимое (p<0,05) различие с группой «интактные»; # - значимое (p<0,05) различие групп: «опыт» и «контроль»; n – количество животных в группе

фоне отравления крыс малатионом. При отравлении крыс малатионом выявлено достоверное снижение УЭ гена *Ache* и *Bche* в головном мозге и печени. Установлено, что применение атропина препятствует снижению УЭ генов *Ache* и *Bche* в головном мозге крыс через 1, 7 и 14 суток после отравления малатионом и предупреждает снижение УЭ гена *Bche* в печени у животных через 1 сутки интоксикации. Показатели уровней экспрессии изучаемых генов возможно использовать при оценке и прогнозировании эффективности перспективных средств лечения отравлений ФОС (реактиваторы ХЭ, гепатотропные препараты и т.д.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Шилов В.В.* и др. Изучение эффективности лекарственных средств на модели экспериментальной нейропатии при отравлении малатионом.// Медицина труда и промышленная токсикология. 2013; 8: 13-18.
2. *Aurbek N.* Suitability of human butyrylcholinesterase as therapeutic marker and pseudocatalytic scavenger inorganophosphate poisoning: A kinetic analysis. Toxicology. 2009; 259: 133-139.
3. *Naik R.S.* et al. Development and validation of a simple assay for the determination of cholinesterase activity in whole blood of laboratory animals.// J. Appl. Toxicol. 2013; 33 (4): 290-300.
4. *Bahar F.G.* et al. Species difference of esterase expression and hydrolase activity in plasma.// J. Pharm. Sci. 2012; 101 (10): 3979-3988.
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. *Бабкин А.В.* и др. Ассоциация полиморфных вариантов гена Bche с активностью бутирилхолинэстеразы крыс после отравления малатионом. // Токсикологический вестник. 2014; 5: 16-20.
7. *Lopez-Granero C.* et al. Chlorpyrifos-, diisopropylphosphorofluoridate-, and parathion-induced behavioral and oxidative stress effects: are they mediated by analogous mechanisms of action. // Toxicol. Sci. 2013; 131 (1): 206-216.
8. Xing, H. et al. Alterations in mRNA expression of acetylcholinesterase in brain and muscle of common carp exposed to atrazine and chlorpyrifos. //Ecotoxicol. Environ. Saf. 2010; 73 (7): 1666-1670.
9. *Миронов А.Н.* и др. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть М.: Гриф и К; 2012.
10. *Осечкина Н.С.* и др. Влияние экспрессии и полиморфизма генов, кодирующих ГАМК-рецепторы, на тяжесть депримирующего действия этанола у крыс.// Токсикологический вестник. 2014; 6: 22-28.
11. *Rhee J. S.* et al. Effect of pharmaceuticals exposure on acetylcholinesterase (AchE) activity and on the expression of AchE gene in the monogonont rotifer Brachionuskoreanus. //Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol. 2013; 158 (4): 216-224.
12. *Zhen H.* Toxic effects of HgCl2 on activities of SOD, AchE and relative expression of SOD, AChE, CYP1A1 of zebrafish.//Ecotoxicology. 2014; 23 (10): 1842-1845.
13. *Charoenying T.* et al. Effects of paraoxon on neuronal and lymphocytic cholinergic systems. //Toxicol. Pharmacol. 2011; 31 (1): 119-128.

REFERENCES:

1. *Shilov V.V.* et al. Study of the effectiveness of drugs in experimental models of poisoning neuropathy in malathion. //Occupational medicine and industrial ecology. 2013; 8: 13-18 (in Russian).
2. *Aurbek N.* Suitability of human butyrylcholinesterase as therapeutic marker and pseudocatalytic scavenger inorganophosphate poisoning: A kinetic analysis. //Toxicology. 2009; 259: 133-139.
3. *Naik R.S.* et al. Development and validation of a simple assay for the determination of cholinesterase activity in whole blood of laboratory animals.// J. Appl. Toxicol. 2013; 33 (4): 290-300.
4. *Bahar F.G.* et al. Species difference of esterase expression and hydrolase activity in plasma.// J. Pharm. Sci. 2012; 101 (10): 3979-3988.
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): 351-3
6. Babkin A.V. et al. Association of Bche gene polymorphic variants with activity of rat butyrylcholinesterase after exposure to malathion.// Toxicological Review. 2014; 5: 16-20 (in Russian).
7. *Lopez-Granero C.* et al. Chlorpyrifos-, diisopropylphosphorofluoridate-, and parathion-induced behavioral and oxidative stress effects: are they mediated by analogous mechanisms of action. // Toxicol. Sci. 2013; 131 (1): 206-216.
8. Xing, H. et al. Alterations in mRNA expression of acetylcholinesterase in brain and muscle of common carp exposed to atrazine and chlorpyrifos. //Ecotoxicol. Environ. Saf. 2010; 73 (7): 1666-16
9. *Mironov A.N.* Guidelines for pre-clinical trials of drugs.Part Moscow. 2012 (in Russian).
10. *Osechkina N.S.* et al. The expression's influence and polymorphism of genes, which encode gaba-receptors, on heft ethanol influence in laboratory rats. // Toxicological Review. 2014; 6: 22-28 (in Russian).
11. *Rhee J. S.* et al. Effect of pharmaceuticals exposure on acetylcholinesterase (AchE) activity and on the expression of AchE gene in the monogonont rotifer Brachionuskoreanus. //Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol. 2013; 158 (4): 216-224.
12. *Zhen H.* Toxic effects of HgCl2 on activities of SOD, AchE and relative expression of SOD, AChE, CYP1A1 of zebrafish. //Ecotoxicology. 2014; 23 (10): 1842-1845.
13. *Charoenying T.* et al. Effects of paraoxon on neuronal and lymphocytic cholinergic systems.//Toxicol. Pharmacol. 2011; 31 (1): 119-128.

A.V. Babkin[1], I.S. Berdinskih[1], N.S. Osechkina[2], G.V. Nazarov[1], M.A. Yudin[1], V.N. Bykov[1]

A STUDY OF ATROPINE INFLUENCE ON ACHE AND BCHE GENES EXPRESSION IN RATS EXPOSED TO MALATHION POISONING

[1]Scientific Research Test Institute of Military Medicine of Medical Military Academy named after S.M. Kirov (The Russian Federation Department of Defense), 195043, Saint-Petersburg, Russian Federation
[2]Federal State Scientific Institution «Institute of Toxicology» Federal Medico-Biological Agency of Russia, 192019, Saint Petersburg, Russian Federation

Levels of expression of *Ache* and *Bche* genes in tissue samples were investigated in rats exposed to malathion in dose of 1 LD_{50} and following atropine treatment. Malathion poisoning causes statistically significant decrease in levels of expression of *Ache* and *Bche* genes in brain and liver. The decrease of expression of these genes was greater than 50 % and remained at this level during 14 days. It was shown that atropine treatment prevents decrease in *Ache* gene expression in brain. These findings suggest the possibility of gene expression level assessment in brain during the screening of promising treatments for OP poisoning.

Keywords: *gene expression, gene Ache, gene Bche, malathion, atropine.*

Переработанный материал поступил в редакцию 16.09.2015 г.

УДК 615.099:546.55/.59

АКТИВНОСТЬ АПОПТОЗА В НЕРВНОЙ ТКАНИ БЕЛЫХ КРЫС ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ АРАБИНОГАЛАКТАНА НАНОСЕРЕБРА

Л.М. Соседова, Е.А. Капустина, М.А. Новиков

ФГБНУ «Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований», 665827, г. Ангарск, Российская Федерация

В статье представлены результаты оценки процесса апоптоза в нейронах белых крыс методом ДНК-комет и иммуногистохимическим анализом определения активности про/антиапоптотических белков caspase 3 и bcl-2 при воздействии нанобиокомпозита, представляющего собой наносеребро, встроенное в матрицу природного полимера-арабиногалактан. В препаратах нервной ткани крыс, подвергшихся воздействию арабиногалактаном наносеребра, установлено статистически значимое увеличение содержания ДНК в хвостах комет. ДНК-кометы с содержанием ДНК в хвосте более 70%, которые можно было бы рассматривать как апоптотические, в исследованных препаратах не наблюдались. Результаты, полученные при иммуногистохимическом определении экспрессии в нейронах анти/проапоптотических белков bsl-2 и caspase-3, наоборот, свидетельствуют о развитии процесса апоптоза в нервных клетках. Сравнивая результаты проведенного исследования, можно сделать заключение о более эффективном выявлении процесса апоптоза при помощи иммуногистохимических методов определения экспрессии анти/проапоптотических белков, чем методом ДНК-комет.

***Ключевые слова**: арабиногалактан наносеребра, белые крысы, апоптоз, генотоксичность, caspase 3, bcl-2, ДНК-кометы.*

Введение. В последние годы благодаря своим уникальным свойствам наночастицы нашли широкое применение в различных областях. Антибактериальные и противогрибковые свойства наночастиц серебра (nAg) позволяют использовать их при производстве одежды, косметики, перевязочного материала, освежителей воздуха, солнцезащитных и гигиенических средств, контейнеров для пищевых продуктов, для дезинфекции воды [1]. Антимикробная способность nAg связана с их сильной окислительной активностью и высвобождением ионов серебра. Однако данные частицы индуцируют окислительное повреждение клеточной мембраны и органелл, в том числе лизосом, митохондрий и ядра, способны вызывать повреждения ДНК, что обусловливает ряд негативных последствий, таких как, цито- и генотоксичность, иммунологические реакции и может привести к развитию апоптоза или некроза клетки [2,3].

Для снижения уровня побочных эффектов и токсичности, пролонгирования действия, увеличения избирательности воздействия создаются новые препараты, основанные на иммобилизации nAg на полимерных матрицах – нанобиокомпозиты. В качестве матрицы в последние годы активно используется природный полимер из лиственницы сибирской – арабиногалактан (АГ) [4].

В наших предыдущих исследованиях по воздействию нанобиокомпозита – арабиногалактана наносеребра (nAg-АГ) на мозг белых крыс с помощью иммуногистохимического метода (ИГХ) выявлены нейроны с повышенной экспрессией белка bsl-2, одной из функций которого, является предотвращение запуска процесса апоптоза, что может быть связано с начавшейся в этих клетках мобилизацией защитных механизмов [5].

Известно, что метод ДНК-комет также позволяет выявить наличие апоптотических клеток

Соседова Лариса Михайловна (Sosedova Larisa Mikhailovna), д.м.н., проф., зав.лабораторией биомоделирования и трансляционной медицины ФГБНУ «Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований», 665827, г. Ангарск, Российская Федерация, sosedlar@mail.ru
Капустина Екатерина Александровна (Kapustina Ekaterina Aleksandrovna), к.м.н., научный сотрудник лаборатории биомоделирования и трансляционной медицины ФГБНУ «Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований», 665827, г. Ангарск, Российская Федерация, tox_lab@mail.ru
Новиков Михаил Александрович (Novikov Mikhail Aleksandrovich), м.н.с., лаборатории биомоделирования и трансляционной медицины ФГБНУ «Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований», 665827, г. Ангарск, Российская Федерация, novik-imt@mail.ru

[6]. Для более полной и информативной оценки процесса апоптоза в нейронах при воздействии нанобиокомпозита представляет интерес сопоставление метода ДНК-комет и ИГХ анализа, что позволит оценить одну из патогенетических сторон программируемой гибели клетки.

Целью исследования являлось изучение поврежденности ДНК, а также активности белков апоптоза caspase 3 и bcl-2 в нервных клетках белых крыс, подвергавшихся воздействию арабиногалактана наносеребра.

Материалы и методы исследования. В состав nAg-АГ входят частицы серебра в нульвалентном состоянии, стабилизированные АГ, находящимся в аморфной фазе. Параметры ячейки серебра-0,4 нм. Частицы серебра имеют сферическую форму, размер варьируется от 3 до 27 нм. Нанобиокомпозит является узкодисперсным: доля частиц с размерами в интервале 6-12 нм составляет 80%, содержание серебра – 16,73%. Молекулярная масса около 12 кДа. Вещество было синтезировано в институте химии имени А.Е. Фаворского СО РАН (Иркутск, Россия) [7,8].

Для проведения исследования из вивария ФГБНУ «ВСИМЭИ» получены нелинейные белые крысы-самцы в трёхмесячном возрасте массой 200-240 г, которые были разделены на четыре группы по 8 особей.

Животным первой и второй групп внутрижелудочно через зонд на протяжении 9 дней вводили водный раствор nAg-АГ из расчёта 100 мкг и 500 мкг серебра на килограмм массы соответственно (nAg-АГ 100 и nAg-АГ 500). Белые крысы третьей группы получали в эквивалентных количествах раствор АГ, особи четвертой (контрольной) группы – дистиллированную воду.

На следующий день после последнего введения испытуемых растворов животных декапитировали, быстро извлекали головной мозг, 200 мг ткани которого использовали для дальнейшего анализа методом ДНК-комет согласно методике [9]. Окраска препаратов осуществлялась SYBR Green I, регистрацию проводили на микроскопе «OLYMPUS BX-52», совмещенном с цифровой камерой «OLYMPUS RX-420» при увеличении «х100». Изображения ДНК-комет (по 100 клеток от каждого животного) анализировали с помощью программы «CASP 1.2.2». В качестве показателя поврежденности ДНК использовали процентное содержание фрагментов ДНК в хвосте комет.

Иммуногистохимическое исследование активности белков проводили с помощью моноклональных антител (Lab Vision Corporation, США) и вторичных антител, конъюгированных с полимером и пероксидазой (Lab Vision Corporation). Визуализацию прореагировавших первичных антител производили при помощи хромогена DAB+ (Lab Vision Corporation). Выявление экспрессии осуществляли на парафиновых срезах. Для этого осуществляли депарафинизацию срезов по общепринятой методике: препараты опускали в ксилол на 10 мин, затем в 96^0 спирт на 5-6 мин, в 70^0-80^0 спирт на 2-3 мин, после чего промывали образец погружением в дистилированную воду на 10 мин. Затем для блокирования эндогенной пероксидазы срезы обрабатывали 3% перекисью водорода в течение 5-10 мин. По окончании этой процедуры срезы помещали в 1xPBS (pH 7,5) на 5-10 мин, для блокирования неспецифического фонового окрашивания обрабатывали 5% BSA в течение 10 мин. При последующем нанесении первичных моноклональных антител предметные стекла помещали во влажную камеру для предотвращения высыхания препаратов и, как следствие, развития неспецифической фоновой реакции, ставили в хладотермостат (t= 4-8°C) на 18 часов. После этого срезы помещали в 1xPBS на 5 мин. Далее на образцы наносили вторичные антитела и оставляли при комнатной температуре в течение 30 мин, после чего излишки антигена удаляли погружением срезов в 1xPBS на 5 мин. На следующем этапе проводили обработку коньюгатом стрептавидина и пероксидазой в течение 15 мин, с последующей промывкой препаратов в 1xPBS в течение 5 мин. Далее на срезы наносили хромоген DAB+ для визуализации окрашенного продукта, контролируя степень окраски под микроскопом. После достижения оптимального уровня окрашивания препараты промывали дистиллированной водой в течение 10-15 мин, после чего проводили подкрашивание толуидиновым синим в течение 5 мин. После промывания дистиллированной водой в течение 1 минуты срезы помещали в 96^0 спирт для дифференцировки окрашивания нейронов. На заключительном этапе препараты обезвоживали в абсолютном этаноле и в смеси этанола с орто-ксилолом 1:1 по 2-3 мин в каждом реагенте. Просветляли в орто-ксилоле и заключали в полистирол.

Результаты обрабатывали с использованием критерия Краскела-Уоллиса для несвязанных групп, критерия Вилкоксона для связанных выборок и критерия Манна-Уитни с применением ППП «STATISTICA 6.1» (StatSoft). При иммуногистохимическом исследовании отличия считали статистически значимыми при значении $p<0,01$, при исследовании генотоксичности – $p<0,02$ с учетом поправки Бонферрони.

Все животные содержались в стандартных условиях вивария со свободным доступом к во-

Таблица 1

Содержание ДНК в хвосте комет нейронов коры головного мозга белых крыс

Группы	%ДНК в хвосте комет, $Me(Q_{25}-Q_{75})$	min-max	p при сравнении с контролем
Контроль	0,43(0,07-1,97)	0,01-18,19	
АГ	0,46(0,06-2,27)	0,01-15,02	0,92
nAg-АГ100	12,0(5,69-19,91) *	0,01-58,99	0,001
nAg-АГ500	5,47(2,01-9,02) *	0,01-46,87	0,000002

*Примечания:** - различия статистически значимы по сравнению с контрольной группой при p<0,01; Статистическая значимость рассчитывалась по критерию Манна-Уитни.

де и пище. Исследования проводились в соответствии с «Правилами лабораторной практики» (Приказ МЗСР РФ № 708н от 23.08.2010 г.).

Результаты и обсуждение. Исследование поврежденности ДНК в нейронах коры головного мозга экспериментальных животных выявило, что процентное содержание ДНК в хвостах комет у особей, получавших АГ, и контрольных не имело различий (табл.1).

Однако у крыс обеих групп, подвергшихся воздействию nAg-АГ, выявлено статистически значимое увеличение содержания ДНК в хвостах комет и, следовательно, поврежденность ДНК. При сравнении групп nAg-АГ100 и nAg-АГ500 выявлен больший уровень деструкции ДНК у особей в первой группе (p=0,0002).

Следует отметить, что в исследованных препаратах не наблюдались ДНК-кометы с содержанием ДНК в хвосте более 70% (табл.1), которые можно было бы рассматривать как апоптотические [6]. ДНК-кометы характерной формы (апоптотические «ежики») встречались в образцах нервной ткани в единичных количествах, как в контрольной, так и опытных группах.

Проведенное иммуногистохимическое исследование экспрессии в нейронах белка bcl-2, являющегося ингибитором процесса апоптоза в клетке, выявило, что в группе nAg-АГ100 наблюдалось статистически значимое увеличение процентного содержания живых клеток, в которых обнаружены признаки повышенной экспрессии данного белка, а также уже погибших нейронов с повышенной экспрессией bcl-2 (табл.2). Обращает на себя внимание тот факт, что подобные изменения не обнаружены в группе nAg-АГ500.

При исследовании экспрессии в нервных клетках головного мозга белка caspase-3, который, напротив, является активатором апоптоза, наблюдалось статистически значимое увеличение процентного содержания живых и погибших клеток, экспрессирующих данный белок: в группе nAg-АГ100, по сравнению с группой АГ, а группе nAg-АГ500 – эти изменения значимы по сравнению с контрольными значениями и с группой АГ. Полученные результаты свидетельствовали о том, что в погибших и живых нейронах экспрессия данного апоптотического белка происходит или происходила усиленно, что привело к гибели одних, и регистрации повышенного уровня белка в других (табл.2)

Выявленные результаты экспрессии caspase-3 позволяют предположить активацию апоптотических процессов в нейронах уже на 10-й день после окончания воздействия нанобиокомпозита. Это сочетается с данными экспрессии ингибитора апоптоза bcl-2, который в ответ на активацию апоптотического процесса начинает в эти же сроки оказывать протективное действие, особенно выраженное при воздействии nAg-АГ100. Считаем необходимым отметить отсутствие достоверных различий в экспрессии изучаемых белков в группе животных, получивших в эквивалентных количествах раствор АГ, т.е. собственно матрица (арабиногалактан) не оказывала влияния на индукцию апоптоза в клетках головного мозга.

Таким образом, в представленном исследовании у животных, подвергавшихся воздействию nAg-АГ, выявлен повышенный уровень поврежденности ДНК в клетках головного мозга, что позволяет свидетельствовать о на-

Таблица 2

Экспрессия bcl-2 и caspase-3 при воздействии АГ, nAg-АГ100 и н nAg-АГ500 (% от общего количества клеток в 0.2 мм^2), Med (Q_{25} – Q_{75}), n=10

Группы	Bcl-2		Caspase-3	
	Погибшие клетки с экспрессией белка	Живые клетки с экспрессией белка	Погибшие клетки с экспрессией белка	Живые клетки с экспрессией белка
контроль	0,59 (0,52-0,62)	2,07 (1,55-2,19)	0,68 (0,52-0,96)	1,93 (1,76-2,09)
АГ	0,57 (0,43-0,99)	3,89 (2,46-5,92)	0,33 (0-0,67)	1,92 (1,66 -2,1)
nAg-АГ100	0,93 (0,53-1,68) ♦	5,04 (4,3-5,35)* ♦	1,1 (0,49-1,4)♦	4,9 (2,34-12,8)♦
nAg-АГ500	0 (0-0)	2,67 (0-3,57)	2,74 (1,96-3,24)* ♦	5,1 (3,18-8,24)*♦

*Примечание:** - различия статистически значимы по сравнению с контрольной группой при p<0,01; ♦ - различия статистически значимы по сравнению с группой АГ при p<0,01 . Статистическая значимость рассчитывалась по критерию Манна-Уитни.

личии генотоксического эффекта. Причем при воздействии меньшей дозы nAg-АГ100 содержание ДНК в хвосте комет клеток головного мозга белых крыс встречалось значимо (более чем в 2 раза) чаще, чем при введении дозы nAg-АГ500. То есть в данном случае наблюдалась парадоксальная генотоксичность: нарушение принципа «доза-эффект», когда меньшая доза (концентрация) вызывает больший эффект, чем существенно более высокая. Вместе с тем, невысокая степень содержания ДНК в хвостах комет не позволяет однозначно предполагать о развитии процесса апоптоза в нервных клетках.

Наряду с этим результаты, полученные при иммуногистохимическом определении экспрессии в нейронах анти/проапоптотических белков bsl-2 и caspase-3 свидетельствуют об обратном. Наносеребро, инкапсулированное в полимерную матрицу, при подостром введении в организм экспериментальных животных способно индуцировать в нейронах коры головного мозга запуск апоптотического каскада. Установлено, что после девятикратного введения обоих доз nAg-АГ в клетках нервной ткани головного мозга белых крыс резко возрастает количество нейронов, продуцирующих белок caspase-3, достоверное по отношению к результатам групп с введением чистого АГ, так и контрольной.. Наряду с этим у крыс, получивших nAg-АГ100, отмечалось значимое возрастание количества нейронов, экспрессирующих bcl – 2, однако, активности данного антиапоптотического белка в нейронах коры головного мозга не хватает для предотвращения апоптоза и формирования внутриклеточных защитных механизмов. Обращает на себя внимание факт отсутствия повышения экспрессии белка bcl – 2 при воздействии дозы nAg-АГ500, что может быть связано с подавлением активности данного белка в ответ на введение большей дозы наносеребра, наряду с резким возрастанием внутриклеточной продукции апоптотического белка caspase-3, свидетельствующего о запуске механизмов модуляции процесса апоптоза.

Заключение. Сравнивая результаты проведенного исследования можно предварительно сделать заключение, что при данных условиях моделирования более эффективным является выявление процесса апоптоза при помощи иммуногистохимических методов определения экспрессии анти/проапоптотических белков, чем методом ДНК-комет. Учитывая, что в данных исследованиях проведено подострое введение нАГ, можно предположить, что процесс апоптоза находится на ранней стадии своего развития, тогда как деградация ДНК происходит на заключительных этапах апоптотического процесса.

В целом представленные результаты свидетельствуют о сохранении токсических свойств nAg даже при заключении их в матрицу арабиногалактана, что подтверждается и с данными ранее выполненного гистологического обследования [10].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Chin-Lin H.,* I-Lun H., Ho-Chen L., Chu-Fang W., Yuh-Jeen H.,. Chun-Yu Ch. Silver nanoparticles affect on gene expression of inflammatory and neurodegenerative responses in mouse brain neural cells. //Environmental Research. 2015; 136: 253–263.
2. *Tianlu Z., Liming W., Qiang C., Chunying C.* Cytotoxic Potential of Silver Nanoparticles. Yonsei Med J. 2014; 55 (2): 283-2
3. Danielle McShan, Paresh C., Ray Hongtao Yu. Molecular Toxicity Mechanism of Nanosilver.// J. Food Drug Anal. 2014; 22(1): 116–127.
4. *Medvedeva S., Aleksandrova G., Grischenko L.*. Transformation of larch polysaccharide. The 11th Intern.Symp. on Wood Pulp Chem. Nice, France. 2001; II: 123-126.
5. *Novikov M.A.* Expression of apoptosis protein bsl-2 in nerve cells indused by silner nanoparticles encapsulated in polymer matrix. Second International school-conference «Applied nanotechnology and nanotoxicology» (ANT 2013). August 15-19, 20Listvyanka, Baikal Lake, Irkutsk Region.
6. *Чаушева А.И., Никитина В.А., Жанатаев А.К., Дурнев А.Д., Бочков Н.П.* ДНК повреждения в мультипотентных мезенхимных стромальных клетках человека при разных сроках культивирования. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2011; VI(4): 39-41.
7. *Shurygina I.A.,* Sukhov B.G., Fadeeva T.V., Umanets V.A., Shurygin M.G., Ganenko T.V., Kostyro Y.A., Grigoriev E.G., Trofimov B.A. Bactericidal action of Ag(0)-antithrombotic sulfated arabinogalactan nanocomposite: coevolution of initial nanocomposite and living microbial cell to a novel nonliving nanocomposite// Nanomedicine. Nanotechnology, Biology, and Medicine. 2011; 7: 827–833.
8. *Trofimov B.A., Sukhov B.G., Aleksandrova G.P., Medvedeva S.A., Grishchenko L.A., Malkina A.G.,* et al. Nanocomposites with magnetic,optical, catalytic, and biologically active properties based on arabinogalactan. Doklady Chemistry. 2003; 393 (4-6): 287-288.
9. Применение метода щелочного гель-электрофореза изолированных клеток для оценки генотоксических свойств природных и синтетических соединений. Методические рекомендации. М.; 2006.
10. *Соседова Л.М., Новиков М.А., Титов Е.*А Морфо-функциональная оценка эффектов действия наночастиц серебра, инкапсулированных в полимерную матрицу. Актуальные проблемы транспортной медицины. 2014; (37): 77-83.

REFERENCES:

1. *Chin-Lin H.,* I-Lun H., Ho-Chen L., Chu-Fang W., Yuh-Jeen H.,. Chun-Yu Ch. Silver nanoparticles affect on gene expression of inflammatory and neurodegenerative responses in mouse brain neural cells. //Environmental Research. 2015; 136: 253–263.
2. *Tianlu Z., Liming W., Qiang C.,* Chunying C. Cytotoxic Potential of Silver Nanoparticles. Yonsei Med J. 2014; 55 (2): 283-2
3. Danielle McShan, Paresh C. Ray Hongtao Yu. Molecular Toxicity Mechanism of Nanosilver.// J. Food Drug Anal. 2014; 22(1): 116–127.
4. *Medvedeva S., Aleksandrova G., Grischenko L.*. Transformation of larch polysaccharide. The 11th Intern.Symp. on Wood Pulp Chem. Nice, France. 2001; II: 123-126.
5. *Novikov M.A.* Expression of apoptosis protein bsl-2 in nerve cells indused by silner nanoparticles encapsulated in polymer matrix. Second International school-conference «Applied nanotechnology and nanotoxicology» (ANT 2013). August 15-19, 20Listvyanka, Baikal Lake, Irkutsk Region.
6. *Chausheva A.I., Nikitina V.A., Zhanataev A.K., Durnev A.D., Bochkov N.P.* DNA damage of multipotent mesenchymal stromal cells of the person at different stages of cultivation. Kletochnaya transplantologiya i tkanevaya inzheneriya. 2011; VI(4): 39-41.(in Russian)
7. *Shurygina I.A.,* Sukhov B.G., Fadeeva T.V., Umanets V.A., Shurygin M.G., Ganenko T.V., Kostyro Y.A., Grigoriev E.G., Trofimov B.A. Bactericidal action of Ag(0)-antithrombotic sulfated arabinogalactan nanocomposite: coevolution of initial nanocomposite and living microbial cell to a novel nonliving nanocomposite// Nanomedicine. Nanotechnology, Biology, and Medicine. 2011; 7: 827–833.
8. *Trofimov B.A., Sukhov B.G., Aleksandrova G.P., Medvedeva S.A., Grishchenko L.A., Malkina A.G.,* et al. Nanocomposites with magnetic,optical, catalytic, and biologically active properties based on arabinogalactan. Doklady Chemistry. 2003; 393 (4-6): 287-288.
9. Application of alkaline gel electrophoresis of isolated cells to assess genotoxic properties of natural and synthetic compounds. Metodicheskie rekomendatsii. M.; 2006. (in Russian)
10. *Sosedova L.M., Novikov M.A., Titov E.A.* Morpho-functional assessment of action effects of silver nanoparticles encapsulated in a polymer matrix. Aktual'nye problemy transportnoy meditsiny. 2014; (37): 77-83. (in Russian)

L.M. Sosedova, E.A. Kapustina, M.A. Novikov

ACTIVITY OF APOPTOSIS IN THE NERVE TISSUE OF WHITE RATS EXPOSED TO NANOSILVER ARABINOGALACTAN

East-Siberian Institute of *Medico-Ecological Researches,* 665827, Angarsk, Russian Federation

The article presents results of apoptosis evaluation in albino rat neurons using comet assay for DNA and immune histochemical analysis to determine the activity of pro-and anti--apoptotic proteins caspase 3 and bcl-2 at exposure to nano biocomposites representing nano silver embedded in a matrix of a natural arabinogalactan. In preparations of nervous tissue of rats exposed to nano silver arabinogalactan polymer, a statistically significant increase of DNA content in comet tails was found out. DNA comets with DNA tail content of more than 70%, which could be regarded as apoptotic have not been observed in investigated formulations. The results of the immune histochemical determination of expression of anti-and pro- apoptotic proteins bcl-2 and caspase-3 in neurons show on the contrary the development of apoptosis in nerve cells. Comparing results of the studies performed, a conclusion can be drawn that to detect the apoptosis process, immune histochemical methods for determination of anti-and pro-apoptotic proteins are more efficient than DNA comet assay.

Keywords*: nanosilver arabinogalactan, white rats, apoptosis, genotoxicity, caspase 3, bcl-2, DNA-comets.*

Переработанный материал поступил в редакцию 14.09.2015 г.

УДК:612.112.94+636.3.,546.815

СИНТЕЗ ДНК В ЛИМФОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ОВЕЦ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ПОСТУПЛЕНИИ СВИНЦА С РАЦИОНОМ

Э.Б. Мирзоев, В.О. Кобялко, И.В. Полякова, О.А. Губина, Н.А. Фролова

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт радиологии и агроэкологии», 249032, г. Обнинск, Калужской обл., Российская Федерация

Исследования были проведены на 12 овцах романовской породы, живой массой 33,0±1,1 кг, в возрасте 1-1,5 года. Животные были разделены на 4 группы по 3 особи в каждой: 1 группа – контроль. 2, 3 и 4 группы ежедневно в течение 90 суток исследования с рационом получали нитрат свинца в концентрациях 5, 25 и 150 мг/кг корма. С учетом рациона (2 кг корма) суточное поступление металла в среднем составило 10, 50 и 300 мг, соответственно. В лимфоцитах периферической крови определяли общий и репаративный синтез ДНК. Образцы крови отбирали из яремной вены до кормления на 7-е, 14-е, 28-е, 42-е, 56-е, 70-е и 90-е сутки интоксикации. Хроническое поступление свинца с рационом в организм овец характеризуется изменением общего и репаративного синтеза ДНК в лимфоцитах периферической крови. При низких уровнях свинца в рационе (5 мг/кг) в зависимости от срока исследования отмечали активацию или ингибирование синтетических и репарационных процессов. С увеличением концентрации металла в рационе (25 и 150 мг/кг) в лимфоцитах периферической крови наблюдали усиление общего и репаративного синтеза ДНК. Наиболее выраженный характер изменений регистрировали у животных 4-й группы (150 мг/кг). Предполагается, что при хроническом воздействии свинца основной вклад в интенсивность общего синтеза ДНК в лимфоцитах периферической крови овец вносит активация репарационных процессов.

Ключевые слова: *овцы, лимфоциты, периферическая кровь, свинец, общий и репаративный синтез ДНК.*

Введение. Ранее нами было показано, что поступление свинца с рационом в организм овец в течение 90 суток исследования характеризуется увеличением содержания металлотионеинов в лимфоцитах периферической крови при одновременном снижении жизнеспособности клеток. При этом количество общего белка в лимфоцитах в начальные сроки интоксикации (7 сутки) возрастало, а в последующие – было ниже контрольных значений [1]. Предполагается, что повышение уровня металлотионеинов обусловлено амплификацией МТ-генов вследствие повреждения ДНК [2]. Более того, металлотионеины стимулируют репликативный синтез ДНК и пролиферацию клеток костного мозга мышей [3], хотя, активация синтеза ДНК происходит при отсутствии изменений мРНК МТ [4].

Функционирование и стабильность генома, в основном, обеспечиваются репарацией ДНК, так как ингибирование репарационных процессов приводит к увеличению частоты спонтанных и индуцированных мутаций и, в конечном итоге, гибели клеток. Следует отметить, что закономерности генетических нарушений при хроническом воздействии свинца получены в экспериментах на лабораторных животных и при проведении эпидемиологических исследований [5,6,7]. Сведения об интенсивности репарационных процессов в лимфоцитах перифе-

Мирзоев Эльдениз Балабек оглы (Mirzoev Eldeniz Balabek ogly), д.б.н., вед. н. с. лаборатории радиобиологии и экотоксикологии сельскохозяйственных животных ФГБНУ ВНИИРАЭ, 249032, г. Обнинск, Калужской обл., Российская Федерация, mirzoev.ed@yandex.ru
Кобялко Владимир Олегович (Kobyalko Vladimir Olegovich), к..б.н., зав. лабораторией радиобиологии и экотоксикологии сельскохозяйственных животных ФГБНУ ВНИИРАЭ, 249032, г. Обнинск, Калужской обл., Российская Федерация, kobyalko@yandex.ru
Полякова Ирина Владимировна (Polyakova Irina Vladimirovna), мл.н.с. лаборатории радиобиологии и экотоксикологии сельскохозяйственных животных ФГБНУ ВНИИРАЭ, 249032, г. Обнинск, Калужской обл., Российская Федерация, irinaamchenkina@mail.ru
Губина Ольга Александровна (Gubina Olga Aleksandrovna), н.с. лаборатории радиобиологии и экотоксикологии сельскохозяйственных животных ФГБНУ ВНИИРАЭ, 249032, г. Обнинск, Калужской обл., Российская Федерация, Olgubina@yandex.ru
Фролова Наталья Александровна (Frolova Natalya Aleksandrovna), к.б.н., н.с. лаборатории радиобиологии и экотоксикологии сельскохозяйственных животных ФГБНУ ВНИИРАЭ, 249032, г. Обнинск, Калужской обл., Российская Федерация, nafc@yandex.ru

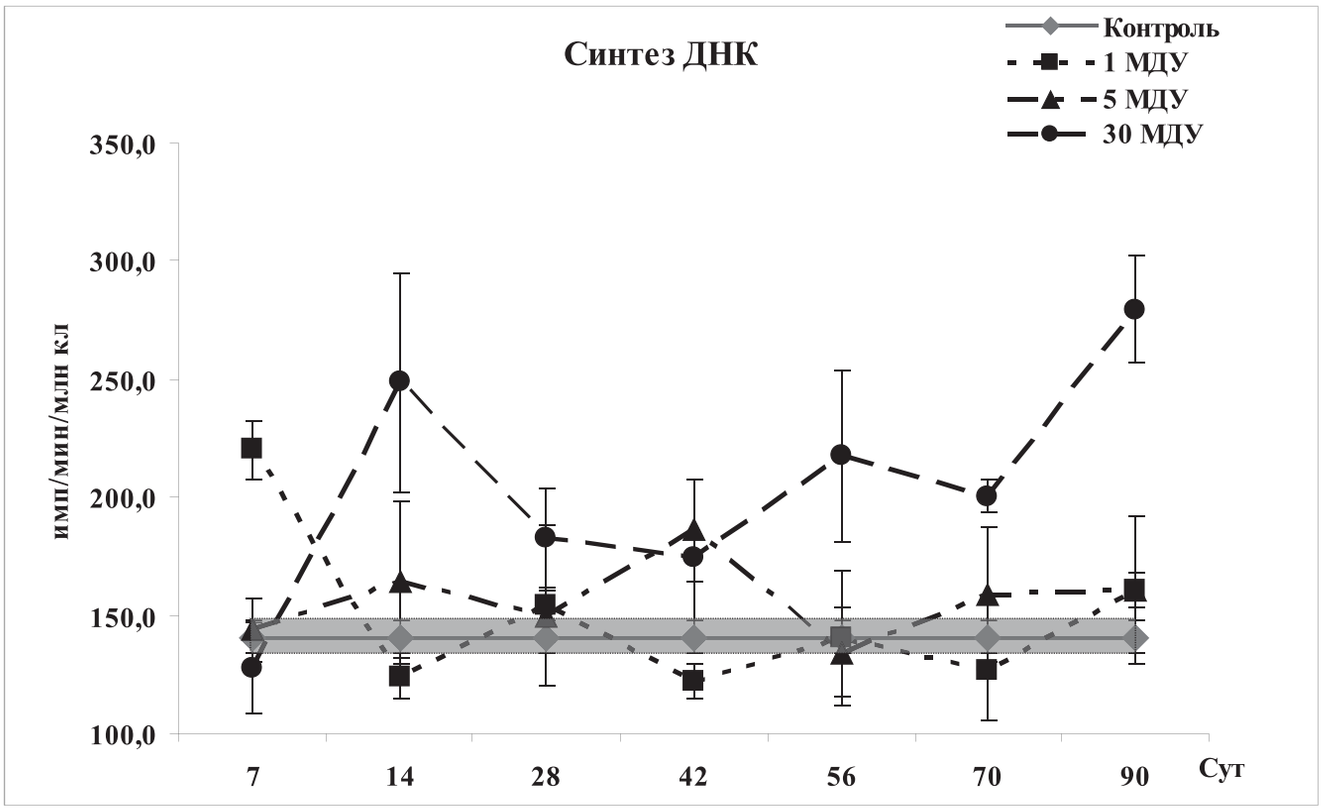


Рис.1. Синтез ДНК в лимфоцитах периферической крови овец при хроническом поступлении свинца с рационом в концентрациях 5, 25 и 150 мг/кг корма.
МДУ – максимально допустимый уровень; 1 МДУ – 5 мг/кг корма; 5 МДУ – 25 мг/кг корма; 30 МДУ – 150 мг/кг корма

рической крови овец при хроническом воздействии свинца отсутствуют. В связи с этим *целью исследования* стала оценка общего и репаративного синтеза ДНК в лимфоцитах периферической крови овец при хроническом поступлении нитрата свинца с рационом в разных концентрациях.

Материалы и методы исследования. Исследования были проведены на 12 овцах романовской породы, живой массой 33,0±1,1 кг, в возрасте 1-1,5 года. Содержание, кормление и уход за животными осуществляли в соответствии с требованиями "Правил лабораторной практики проведения работ с использованием экспериментальных животных" (Приказ Минздравсоцразвития России от 23.08.2010 г. №708 н). Овец содержали в условиях вивария Федерального государственного бюджетного научного учреждения "Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии, биохимии и питания сельскохозяйственных животных", кормили 2 раза в сутки при свободном доступе к воде. Рацион включал 0,3 кг комбикорма и 2 кг сена разнотравного. Рецепт комбикорма в %: ячмень – 44; пшеница – 41,4; шрот подсолнечный – 11,7; соль поваренная – 1; обесфторенный фосфат – 1; премикс – 1. Состав сена в %: сырое вещество – 87,9; протеин – 8,89; жир – 2,26; клетчатка – 32,6; зола – 4,26;

Животные были разделены на четыре группы по 3 особи в каждой. 1 группа (интактные животные) служила контролем. Овцы 2-й, 3-й и 4-й групп ежедневно в течение 90 суток исследования получали с рационом нитрат свинца в концентрациях 5 мг/кг, 25 мг/кг и 150 мг/кг корма, соответственно. Содержание свинца в рационе животных 2-й группы соответствовало максимально допустимому уровню (1 МДУ) металла в кормах, 3-й группы – 5 МДУ, 4-й группы – 30 МДУ. Нитрат свинца задавали с комбикормом один раз в сутки с учетом количества корма (в среднем 2 кг), поступающего в желудочно-кишечный тракт. Для этого 100 г комбикорма смешивали с 50 мл раствора нитрата свинца необходимой концентрации. При этом суточное поступление металла для овец 2-й группы составило 10 мг, 3-й группы – 50 мг, 4-й группы – 300 мг, а доза воздействия, соответ-

ственно, – 0,3 мг/кг; 1,52 мг/кг и 9,1 мг/кг веса. Образцы крови брали из яремной вены овец до кормления на 7-е, 14-е, 28-е, 42-е, 56-е, 70-е и 90-е сутки исследования. В качестве антикоагулянта использовали цитрат натрия.

Лимфоциты периферической крови животных выделяли методом центрифугирования в градиенте плотности фиколл-пака [9, 10]. Жизнеспособность клеток определяли в тесте с трипановым синим. Общий синтез ДНК в лимфоцитах периферической крови овец оценивали по включению ^{3}Н-тимидина. Лимфоциты периферической крови овец (5 млн. клеток/мл) инкубировали 30 мин в среде содержащей 145 ммоль/л NaCl, 2 ммоль/л KCl, 1 ммоль/л $MgCl_2$, 0,5 ммоль/л K_2HPO_4, 10 ммоль/л HEPES-трис, 5 ммоль/л глюкозы (pH 7,5; t-37^{0}C). Затем добавляли 37 кБк ^{3}Н-тимидина и инкубировали 60 мин. Для остановки реакции использовали 10% раствор ТХУ и через 20 час содержимое пробирок переносили на фильтры с диаметром пор 1,2 мкм («Millipore»). Активность отмытых и высушенных фильтров измеряли в смеси ЖС-106. В качестве нулевой пробы использовали аликвоту суспензии клеток после добавления ^{3}Н-тимидина и фильтрации.

При оценке репаративного синтеза ДНК в суспензию лимфоцитов наряду с ^{3}Н-тимидином добавляли гидроксимочевину (конечная концентрация 10 ммоль/л). Радиоактивность образцов измеряли на жидкостно-сцинтилляционном счетчике («Triathler multilabel tester», Финляндия), (имп/мин/10^{6}клеток).

Статистическую обработку результатов проводили методом вариационной статистики с использованием t-критерия Стьюдента. Различия значений считали достоверными при $p<0,05$ [11].

Результаты и обсуждение. Оценка общего синтеза ДНК в лимфоцитах периферической крови интактных овец (контрольная группа) не обнаружила существенных отклонений в течение всего периода исследования и в среднем составила 140,7±6,9 имп/мин/млн кл (рис. 1). У животных 2-й группы (1 МДУ) изменения значений показателя носили нелинейный характер. Так, на 7-е, 28-е и 90-е сутки исследования наблюдали увеличение синтеза ДНК относительно контроля на 56,4 % ($p<0,05$), 9,5 % и 14,4 %, а на 14-е, 42-е и 70-е – ингибирование на 12,2 %, 13 % и 9,8 %. В то же вре-

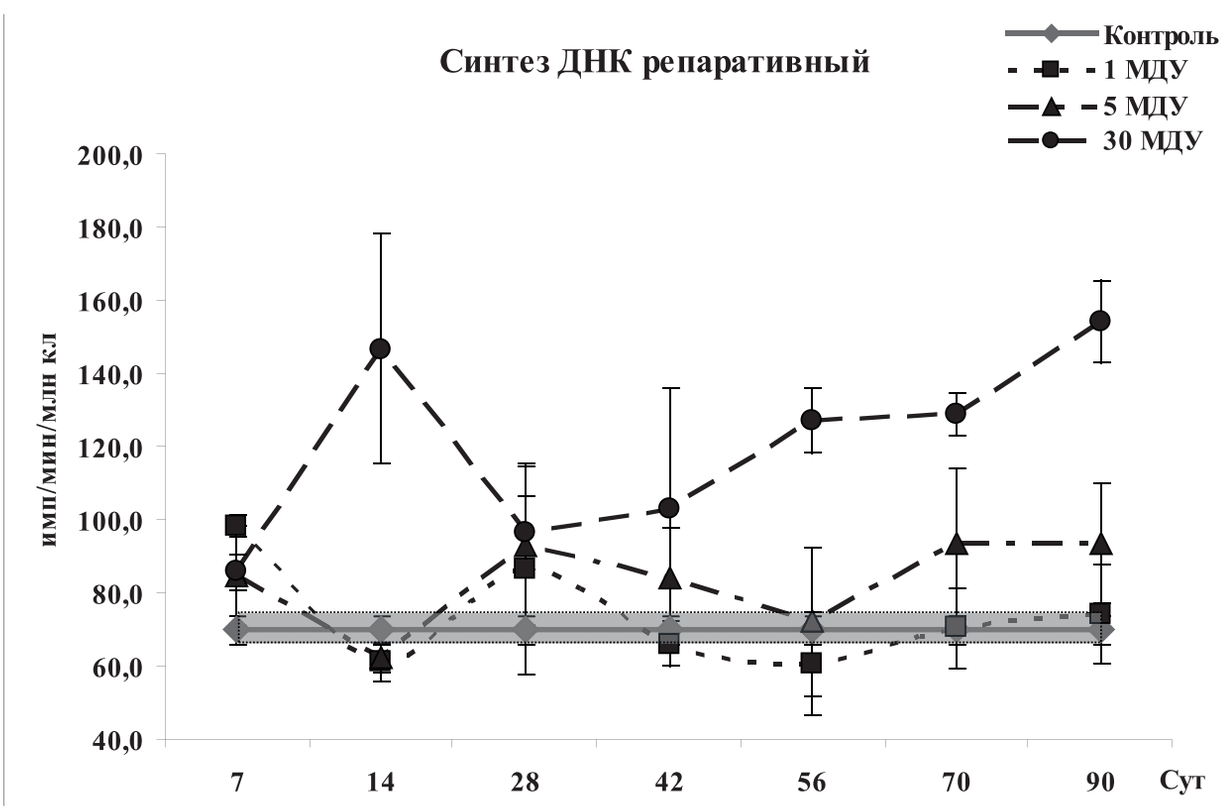


Рис.2. Репаративный синтез ДНК в лимфоцитах периферической крови овец при хроническом поступлении свинца с рационом в концентрациях 5, 25 и 150 мг/кг корма.

мя у овец 3-й группы (5 МДУ) отмечали тенденцию к росту значений показателя практически во все сроки исследования. С увеличением концентрации свинца в рационе (30 МДУ) интенсивность общего синтеза ДНК в лимфоцитах периферической крови возрастала. Достоверные различия значений у животных 4-й группы (30 МДУ) регистрировали на 14-е (77 %), 56-е (54 %), 70-е (43 %) и 90-е (99 %) сутки интоксикации.

Следовательно, хроническое поступление нитрата свинца с рационом в организм овец модифицирует интенсивность синтеза ДНК в лимфоцитах периферической крови. При низких уровнях свинца в рационе в зависимости от срока исследования наблюдали активацию или ингибирование процесса. В то же время увеличение концентрации металла в рационе приводило к росту значений показателя. Наиболее выраженный характер изменений отмечали у животных 4-й группы (30 МДУ).

Оценка интенсивности репаративного синтеза ДНК в лимфоцитах периферической крови интактных овец (контрольная группа) также не выявила существенных отклонений, и в среднем составила 70,0±3,8 имп/мин/млн кл (рис. 2). У овец 2-й группы (1 МДУ) изменения значений показателя носили нелинейный характер. На 7-е, 28-е и 90-е сутки интоксикации интенсивность репарационных процессов была выше контроля на 41 % ($p<0,05$), 23 % и 6 %, а на 14-е, 42-е и 70-е – ниже на 12,6 %, 5,6 % и 5,8 %. В то же время у овец 3-й группы (5 МДУ) наблюдали тенденцию к росту величины показателя практически во все сроки исследования. С увеличением концентрации свинца в рационе (30 МДУ) отмечали активацию репаративного синтеза ДНК в лимфоцитах периферической крови. Достоверные различия значений у животных 4-й группы (30 МДУ) регистрировали на 7-е (22 %), 14-е (110 %), 28-е (38 %), 56- е (82 %), 70-е (101 %) и 90-е (180 %) сутки интоксикации.

Следовательно, хроническое поступление нитрата свинца с рационом в организм овец характеризуется модификацией активности репаративного синтеза ДНК в лимфоцитах периферической крови. При низких уровнях свинца в рационе (1 МДУ) в зависимости от срока исследования отмечали усиление или ингибирование интенсивности процесса, а с повышением концентрации металла в рационе (5 и 30 МДУ) репарационная активность возрастала. Наиболее существенные изменения регистрировали у животных 4-й группы (30 МДУ).

Сравнительный анализ полученных результатов выявил аналогичную динамику общего и репаративного синтеза ДНК. Так, при низких уровнях свинца в рационе в зависимости от срока исследования наблюдали усиление или ингибирование общего и репаративного синтеза ДНК, а высоких – активацию. Ярко выраженный характер изменений регистрировали у животных 4-й группы (30 МДУ). Возможно, с увеличением концентрации свинца в рационе и продолжительности его поступления в организм овец содержание металла в периферической крови повышается и, соответственно, токсическая нагрузка на лимфоциты возрастает. Это предположение подтверждают данные о концентрации свинца в периферической крови овец: при 5 мг/кг корма (1 МДУ) – 5,7-11,0 мкг/дл, 25 мг/кг корма (5 МДУ) – 10,1-14,1 мкг/дл, 150 мг/кг корма (30 МДУ) – 22,3-29,5 мкг/дл. (результаты исследования не опубликованы). Следует отметить, что рост повреждений ДНК в клетках периферической крови человека отмечают при уровнях свинца в крови от 25 мкг/дл и выше [12]. При этом повреждение ДНК может быть обусловлено как косвенным, так и прямым воздействием ионов Pb^{2+}[13].

В целом, при хроническом поступлении нитрата свинца в организм овец модификация интенсивности общего и репаративного синтеза ДНК в лимфоцитах периферической крови сказывается на жизнеспособности клеток. Вместе с тем активация общего синтеза ДНК в лимфоцитах периферической крови овец при хроническом воздействии свинца характеризует не только интенсивность репарационных процессов, но и образование металлотионеинов, которые, связывая ионы металла, снижают их токсическое действие [1].

Заключение. Хроническое поступление нитрата свинца с рационом в организм овец в концентрациях 5 (1 МДУ), 25 (5 МДУ) и 150 (30 МДУ) мг/кг корма характеризуется модификацией интенсивности общего и репаративного синтеза ДНК в лимфоцитах периферической крови. При низких уровнях воздействия (1 МДУ) в зависимости от срока исследования наблюдали усиление или ингибирование общего и репаративного синтеза ДНК, а с увеличением токсической нагрузки синтетическая и репарационная активность лимфоцитов возрастала. Предполагается, что при хроническом воздействии свинца основной вклад в рост интенсивности общего синтеза ДНК в лимфоцитах периферической крови овец вносит активация репарационных процессов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Мирзоев Э. Б., Кобялко В. О., Полякова И. В., Губина О. А., Фролова Н. А.* Содержание металлотионеинов и общего белка в лимфоцитах периферической крови овец при хроническом поступлении нитрата свинца с рационом. //Токсикологический вестник. 2014; 6: 36-

2. *Котеров А. Н., Филиппович И. В.* Радиобиология металлотионеинов. Радиационная биология.// Радиоэкология. 1995; 35 (2): 162-180.

3. *Котеров А. Н., Требенок З. А., Пушкарева Н. Б., Никольский А. В.* Возможный механизм противолучевого эффекта металлотионеина: стимуляция репликативного синтеза ДНК и пролиферации клеток костного мозга. Радиационная биология. Радиоэкология. 1998; 38 (3): 432-437.

4. *Zglinicki T.V., Edwall C., Östlund E., Lind B., Nordberg M., Ringertz N.R.* Very low cadmium concentrations stimulate DNA synthesis and cell growth.// Journal of Cell Science. 1992; 103: 1073-1081.

5. U.S. Environmental Protection Agency. Air quality criteria for lead. Volume 1 of 20EPA/600/R-5/144aF.

6. *National Toxicology Program U.S.* Department of Health and Human Services Monograph on health effects of low-level lead. 20

7. *Grover P., Rekhadevi P.V., Danadevi K., Vuyyuri S.B., Mahboob M., Rahman M.F.* Genotoxicity evaluation in workers occupationally exposed to lead. Int J Hyg Environ Health. 2010; 213: 99-106/ doi org/10.1016/j.ijheh.2010.01.05

8. *Narayana K., Al-Bader M.* Ultrastructural and DNA damaging effects of lead nitrate in the liver. Exp. Toxicol. Pathol. 2011; 63:43-51 / doi.org /10.1016/j.etp.2009.09.007.

9. *Сунгуров А. Ю.* Разделение и анализ клеток физическими методами / "Итоги науки и техники". ВИНИТИ. Сер. "Цитология". 1985: 145 с.

10. *Boyum A.* Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. //J. Clin. Invest. 1968; 21:77-89.

11. *Лакин Г. Ф.* Биометрия: Учебное пособие для биол. спец. вузов -4-изд., перераб. и доп. М.: Высш. шк., 19

12. *Minozzo R., Deimling L.I., Santos-Mello R.* Cytokinesis-blocked micronucleus cytome and comet assays in peripheral blood lymphocytes of workers exposed to lead considering folate and vitamin B12 status. Mutat. Res. Genet. Toxocol. Environ. Mutagen. 2010; 697: 24-doi. org/10.1016/j.mrgentox.2010.01.009.

13. *Valverde M., Trejo C., Rojas E.* Is the capacity of lead acetate and cadmium chloride to induce genotoxic damage due to direct DNA-metal interaction? // Mutagenesis. 2001; 16(3):265-270.

REFERENCES:

1. *Mirzoev E.B., Kobyalko V.O., Polyakova I.V., Gubina O.A., Frolova N.A.* Content of metallothioneins and the total protein in sheep peripheral blood lymphocytes under chronic dietary intake of lead nitrate. Toxicological Review. 2014; 6: 36-39 (in Russian).

2. *Koterov A.N., Filippovich I.V.* Raadiobiology of metallothioneins. Radiatsionnaya biologiya.// Radioekologiya. 1995; 35 (2): 162-180 (in Russian).

3. *Koterov A.N., Trebenok Z.A., Pushkareva N.B.,* Nikol'skii A.V. Possible mechanism of metallothionein radioprotective action: the stimulation of DNA replicative synthesis and bone marrow cell proliferation. Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya. 1998; 38 (3): 432-437 (in Russian).

4. Zglinicki T.V., Edwall C., Östlund E., Lind B., Nordberg M., Ringertz N.R. Very low cadmium concentrations stimulate DNA synthesis and cell growth.// Journal of Cell Science. 1992; 103: 1073-1081.

5. U.S. Environmental Protection Agency. Air quality criteria for lead. Volume 1 of 20EPA/600/R-5/144aF.

6. *National Toxicology Program U.S.* Department of Health and Human Services Monograph on health effects of low-level lead. 20

7. *Grover P., Rekhadevi P.V., Danadevi K., Vuyyuri S.B., Mahboob M., Rahman M.F.* Genotoxicity evaluation in workrs occupationally exposed to lead. Int// J Hyg Environ Health. 2010; 213: 99-106/ doi org/10.1016/j.ijheh.2010.01.05

8. *Narayana K., Al-Bader M.* Ultrastructural and DNA damaging effects of lead nitrate in the liver. Exp. Toxicol. Pathol. 2011; 63:43-51 / doi.org /10.1016/j.etp.2009.09.007.

9. Sungurov A Yu. Separation and analise of cells by physical methods / «Itogi nauki I tekhniki VINITI . Ser. «Tsitologiya». 1985: 4. (in Russian).

10. *Boyum A.* Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. //J. Clin. Invest. 1968; 21:77-89.

11. *Lakin G.F.* Biometriya: Uchebnoye posobiye dlya boil. spets.vusov biol. -4-izd., pererab. i dop. M.: Visshaya shkola. 1990. (in Russian).

12. *Minozzo R., Deimling L.I., Santos-Mello R.* Cytokinesis-blocked micronucleus cytome and comet assays in peripheral blood lymphocytes of workers exposed to lead considering folate and vitamin B12 status. Mutat. Res. Genet. Toxocol. Environ. Mutagen. 2010; 697: 24-doi. org/10.1016/j.mrgentox.2010.01.009.

13. *Valverde M., Trejo C., Rojas E.* Is the capacity of lead acetate and cadmium chloride to induce genotoxic damage due to direct DNA-metal interaction? // Mutagenesis. 2001; 16(3):265-270.

E.B. Mirzoev, V.O. Kobyalko, I.V. Polyakova, O.A. Gubina, N.A. Frolova

SYNTHESIS OF DNA IN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES IN SHEEP AT DIETARY CHRONIC INTAKE OF LEAD

«All-Russian Institute of Agricultural Radiology and Agroecology», 249032 Obninsk, Kaluzhskaya Region, Russian Federation

Studies were conducted on 12 sheep of Romanov breed, 1-1.5 years old and weighing 33,0 ± 1.1 kg,. The animals were equally divided at random into 4 groups: group 1st received basic control diet (control group), 2nd, 3rd and 4th groups daily received feed with lead nitrate in concentrations of 5, 25 and 150 mg/kg during the 90 day experiment. With account of daily diet of 2 kg, a daily intake of metal was on average of 10, 50 and 300 mg respectively. A total and reparative DNA synthesis was determined in the peripheral blood lymphocytes. Blood samples were taken from the jugular vein before feeding on the 7th, 14th, 28th, 42nd, 56th, 70th and 90th days of investigation. The chronic lead intake with the diet in sheep was characterized by changes in the total and reparative DNA synthesis in peripheral blood lymphocytes. It was observed that the low level of lead in diet (5 mg/kg) activates or inhibits the synthesis and reparation processes depending on the date of the study. The activation of the total and reparative DNA synthesis in peripheral blood lymphocytes was observed with increase of the metal content in the diet (25 and 50 mg/kg). The most pronounced changes were registered in animals of the 4th group (150 mg/kg). It is supposed that the activation of the reparation process makes the main contribution to the intensity of the total DNA synthesis in peripheral blood lymphocytes at a chronic exposure to lead.

Keywords: sheep, lymphocytes, peripheral blood, lead, total and reparative DNA synthesis.

Переработанный материал поступил в редакцию 28.09.2015 г.

УДК 614.71 : 615.917

МАТЕРИАЛЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ ПО ИЗУЧЕНИЮ ТОКСИЧНОСТИ И ОБОСНОВАНИЮ ПДК ФЕНОЗАНА-23 В АТМОСФЕРНОМ ВОЗДУХЕ НАСЕЛЕННЫХ МЕСТ

Т.К. Валеев, Р.А. Сулейманов, И.М. Нигматуллин, А.А. Гайсин, Н.Р. Рахматуллин

Федеральное бюджетное учреждение науки «Уфимский научно-исследовательский институт медицины труда и экологии человека» Федеральной службы по защите прав потребителей и благополучия человека (ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека» Роспотребнадзора), 450106, г. Уфа, Республика Башкортостан, Российская Федерация

Изучены токсикологические свойства и основные механизмы биологического действия нового химического соединения класса алкилфенолов на лабораторных животных. По результатам экспериментальных исследований установлены токсикометрические параметры, обоснованы уровни предельно-допустимых концентраций в атмосферном воздухе. Объектами исследований являлись: лабораторные животные – кролики, морские свинки, белые крысы, белые мыши; химическое соединение – Фенозан-23.

Ключевые слова: *токсичность, экспериментальные исследования, лабораторные животные, Ф-23.*

Введение. Учитывая возрастающую актуальность применения алкилфенольных антиоксидантов в различных отраслях промышленности, в последние годы значительно увеличились объемы их производства. Однако для некоторых новых алкилфенольных соединений не установлены гигиенические нормативы (ПДК) в объектах окружающей среды, не в полной мере изучены их токсикологические свойства и степень влияния на организм человека.

В связи с этим нами были проведены экспериментальные исследования по изучению токсикологических свойств и обоснованию предельно допустимых концентраций в атмосферном воздухе населенных мест представителя производных класса алкилфенолов – Фенозана-23 (Ф-23), широко применяемого в качестве стабилизатора при производстве полиэтилена, полипропилена, полистирола, химических волокон, каучука, поливинилхлорида, алкидных смол и др.

Ранее нами были выполнены экспериментальные токсикологические исследования схожей группы алкилфенольных соединений (2,6-ди-трет-бутилфенол, 4-метил-2,6-ди-трет-бутилфенол, 2,4-ди-трет-бутилфенол, 2,2-метилен-бис(6-ди(1,1-диметилэтил)-4-метилфенол, 4,4-2,2-метилен-бис(2,6-ди (1,1-диметилэтил)фенол, 1-трет-бутил-4-гексилфенол), в результате которых определены особенности механизмов их биологического действия, установлены токсикометрические параметры, обоснованы и утверждены гигиенические нормативы (ПДК и ОБУВ) в атмосфере населенных мест. В ходе исследований установлено, что изученные алкилфенольные соединения по степени опасности и токсичности для человека относятся к веществам 3-4 классов. Обладают малой летучестью и, как

Валеев Тимур Камилевич (Valeev Timur Kamilevich), к.б.н., старший научный сотрудник отдела медицинской экологии ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека» Роспотребнадзора, 450106, г. Уфа, Республика Башкортостан, valeevtk2011@mail.ru
Сулейманов Рафаил Анварович (Sulejmanov Rafail Anvarovich), д.м.н., заведующий отделом медицинской экологии ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека» Роспотребнадзора, 450106, г. Уфа, Республика Башкортостан, rafs52@mail.ru
Нигматуллин Ирек Минуллович (Nigmatullin Irek Minullovich), к.м.н., врач отделения функциональной диагностики ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека» Роспотребнадзора, 450106, г. Уфа, Республика Башкортостан
Гайсин Альфат Ахатович (Gaysin Alfat Ahatovich), к.м.н., врач отделения функциональной диагностики ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека» Роспотребнадзора, 450106, г. Уфа, Республика Башкортостан
Рахматуллин Наиль Равилович (Rahmatullin Nail Ravilovich), к.м.н., старший научный сотрудник отдела медицинской экологии ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека» Роспотребнадзора, 450106, г. Уфа, Республика Башкортостан

следствие – малой вероятностью острых ингаляционных отравлений. Некоторые представители алкилфенольных соединений (2,4-ди-трет-бутилфенол и 1-трет-бутил-4-гексилфенол) оказывают раздражающее действие на кожу и слизистые оболочки глаз. Все изученные соединения, в большей или меньшей степени влияют на окислительно-восстановительные процессы, ферментативную и кроветворную системы организма. Основными поражаемыми органами и системами являются центральная нервная система, слизистые оболочки глаз, паренхиматозные органы (печень, почки). Сенсибилизирующих свойств и выраженных кумулятивных эффектов не отмечено. Гонадотоксическое, мутагенное, канцерогенное действия алкилфенольных соединений не установлены [1-4].

Целью настоящей работы явилось гигиеническое обоснование среднесуточной и максимальной разовой предельно допустимых концентраций Ф-23 в атмосферном воздухе.

Материалы и методы исследований. Ф-23 представляет собой мелкий порошок от белого до светло-желтого цвета, не имеет запаха, не растворяется в воде, растворяется в этаноле, ацетоне, толуоле, бензоле, хлороформе, мало растворим в спиртах. Химическое название (по IUPAC) – пентаэритритовый эфир 3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенилпропионовой кислоты (синонимы: Фенозан-23, Агидол-110). Эмпирическая формула: $C_{73}H_{108}O_{12}$. ПДК в атмосферном воздухе для данного соединения до проведения исследований отсутствовала. Имеется только ОБУВ в атмосферном воздухе населенных мест на уровне – 0,10 мг/м^3 (ГН 2.1.6.2309-07) и ПДК в воздухе рабочей зоны – на уровне 10 мг/м^3 (ГН 2.2.5.1313-03).

Токсикологические исследования проведены на базе отдела токсикологии ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека» Роспотребнадзора на нелинейных крысах и мышах обоего пола, морских свинках и кроликах. Эксперименты проводили в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных целей.

Экспериментальные исследования по изучению ольфакторного и резорбтивного действия Ф-23 и обоснованию предельно-допустимых концентраций в атмосферном воздухе проведены в соответствии с действующими методическими документами [5-8].

Для определения вещества в воздухе использовали утвержденный химический метод, основанный на улавливании взвешенных частиц Ф-23 фильтром из ткани с последующим определением на жидкостном хроматографе с ультрафиолетовым детектором [9].

Ингаляционное воздействие Ф-23 на животных осуществлялось в 200-литровых камерах с нижним диффузором, через который проводился отсос воздуха. Воздух подавался в камеру через силикогельный поглотитель. Для отбора проб в камере был вмонтирован штуцер на уровне зоны дыхания животных. Камера для контрольных животных находилась в отдельной комнате.

Исследование хронического действия вещества проведено на белых нелинейных крысах-самцах массой тела 200-210 г. Длительность непрерывной ингаляционной экспозиции составила 3 месяца с последующим периодом наблюдения в течение месяца. При оценке функционального состояния целостного организма были использованы следующие показатели: общее состояние, масса тела, спонтанная двигательная активность, суммационно-пороговый показатель (СПП), лактатдегидрогеназа (ЛДГ), аспартатаминотрансфераза (АСТ), аланинаминотрансфераза (АЛТ), щелочная фосфатаза (ЩФ), сульфгидрильная (SH) группа, холестерин, общий белок, количество лейкоцитов, эритроцитов, содержание гемоглобина, масса внутренних органов.

Результаты и обсуждение. При изучении рефлекторного действия вещества пороговая и подпороговая концентрации не установлены, так как при предъявлении волонтерам исследуемого вещества в больших концентрациях (до 300 мг/м^3), на протяжении всего периода эксперимента, в 90 % случаев не обнаруживалось присутствие посторонних запахов (из 20 волонтеров, 18 не находили различия по запаху между чистым воздухом и испытуемым продуктом). На основании этого можно сделать выводы, что вещество Ф-23 не обладает ощутимым запахом, и при нормальных условиях среды не представляет опасности с позиции рефлекторного действия.

Результаты исследований острой токсичности при пероральном введении лабораторным животным позволили отнести Ф-23 к 4 классу опасности – малоопасные вещества (среднесмертельная доза составила 8400 мг/кг (6285,7÷10340,0) (по ГОСТ 12.1.007-76 «ССБТ Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности»). Клиническая картина острой интоксикации развивалась в течение 1-2 часов после введения больших доз продукта. У животных отмечалась адинамия, затрудненное дыхание. Внешний вид животных становился неопрятным. Животные сбивались в угол клетки, у них наблюдался мелкий тремор передних конечностей. В дальнейшем

они принимали лежачее положение. Гибель животных происходила в течение первых суток эксперимента.

Необходимо отметить, что экспериментальные исследования не выявили существенных различий в видовой и половой чувствительности животных к изучаемому веществу (величина $ДЛ_{50}$ Ф-23 для крыс составила 9000 мг/кг, для мышей 8000 мг/кг).

При остром ингаляционном воздействии Ф-23 на лабораторных животных определить среднесмертельную концентрацию (CL_{50}) изучаемых соединений не удалось, так как при механическом создании в ингаляционных камерах максимально достижимых концентраций (на уровне 3900-5500 мг/м^3) и 4-х часовом ингаляционном воздействии на белых крыс, гибель животных не отмечалась в течение всего (14 дневного) периода наблюдения. Порог острого действия (Lim_{ac}) Ф-23 определен на уровне 2977,8 мг/м^3 (по изменениям показателей функционального состояния центральной нервной системы животных).

При исследованиях местного раздражающего действия и кожно-резорбтивных свойств установлено, что продукт не обладает выраженным раздражающим действием и способностью проникать через неповрежденную кожу. Кумулятивные свойства продукта определены как слабовыраженные ($К_{кум.}$=9,6). При изучении аллергенных свойств установлено, что изучаемое вещество не способствует аллергизации организма.

В ходе проведения хронического 3-месячного эксперимента изучено 3 концентрации Ф-23, фактические уровни которых составили: 10,1; 20,5 и 50,7 мг/м^3. При ингаляционном воздействии на крыс максимальной концентрации – 50,7 мг/м^3 были отмечены изменения функционального состояния животных. Так, через 1,5 месяца после начала эксперимента СПП и показатели поведенческих реакций статистически достоверно изменяются и не приходят в норму до конца эксперимента. Количество лейкоцитов у животных опытной группы к концу эксперимента уменьшилось, а затем восстановилось. Количество эритроцитов достоверно снижается к концу эксперимента, однако эта величина находится в пределах физиологических колебаний. Исследование активности ферментов выявило стойкое возрастание активности АЛТ, ЩФ, SH-групп. Можно полагать, что в данном случае повышение активности ферментов в сыворотке крови является следствием повреждения клеточных мембран, которое сопровождается выходом в кровь цитоплазматических ферментов. При определении массы органов достоверных изменений не выявлено.

При экспозиции животных изучаемым веществом в концентрации 20,5 мг/м^3 проявления интоксикации были такие же, как и при действии Ф-23 в концентрации 50,7 мг/м^3, но менее выраженного характера: происходили статистически достоверные изменения двигательной активности, «норкового» рефлекса, СПП. Гематологические изменения характеризовались увеличением количества гемоглобина, биохимические – сдвигами в показателях функционального состояния печени. Следует отметить, что все изменения изучаемых показателей при воздействии продукта в концентрации 20,5 мг/м^3 на организм животных носили обратимый характер

При ингаляционном воздействии вещества в концентрации 10,1 мг/м^3 проявлений интоксикации и изменений функционального состояния организма у подопытных животных не отмечено. Это дает основание считать, что исследуемое вещество в этой концентрации не оказывает отрицательного влияния на организм, а концентрацию 20,5 мг/м^3 можно принять за пороговую.

При проведении исследований по определению отдаленных эффектов установлено, что изучаемое вещество не обладает гонадо- и эмбриотоксическим действиями. Также не выявлено мутагенного влияния вещества.

В результате обработки и анализа полученного материала нами определена среднесуточная ПДК Ф-23, на уровне 8,0 мг/м^3. Так как Ф-23 является веществом, обладающим преимущественно резорбтивным действием, максимальная разовая ПДК определялась на уровне 98% вероятности ее проявления в хроническом эксперименте и составила – 2,0 мг/м^3.

Следует отметить, что Ф-23 оказался наименее токсичным соединением, в ряду исследуемых ранее веществ группы алкилфенолов. Так, например, среднесуточная ПДК для 2,6-ди-трет-бутилфенола, 4-метил-2,6-ди-трет-бутилфенола и 2,4-ди-трет-бутилфенола составила 0,6 мг/м^3, максимальная разовая 2,0 мг/м^3, для 1-трет-бутил-4-гексилфенола – 0,3 мг/м^3 и 1,5 мг/м^3 соответственно [2,4].

Заключение. Алкилфенольное соединение – Фенозан-23 не обладает ощутимым запахом и при нормальных условиях среды не представляет опасности с позиции рефлекторного действия. Неблагоприятные последствия при воздействии Ф-23 в больших концентрациях на организм теплокровных животных носят общетоксический характер, с преимущественным поражением центральной нервной системы и функций печени. Сред-

несмертельные дозы для различных видов лабораторных животных (белые крысы обоих полов, белые мыши) при воздействии Ф-23 находятся на уровне 8000-9000 мг/кг, что позволяет отнести изучаемое соединение к 4 классу опасности (малоопасные вещества). Изученное вещество не обладает выраженным раздражающим действием и способностью проникать через неповрежденную кожу, относится к соединениям со слабо выраженными кумулятивными свойствами, не способствует аллергизации организма, не обладает гонадотоксическим, эмбриотоксическим и мутагенным эффектами.

Разработанные и экспериментально обоснованные уровни гигиенических регламентов Фенозана-23 утверждены Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации и включены в нормативные документы – Дополнение № 7 к ГН 2.1.6.1338-03 – ГН 2.1.62498-09: «Предельно допустимые концентрации (ПДК) загрязняющих веществ в атмосферном воздухе населенных мест».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Рашитова Г.С., Сулейманов Р.А., Валеев Т.К.* Сравнение острой токсичности веществ класса алкилфенолов //Гигиена и санитария, 20– № – С. 80-81.
2. *Сулейманов Р.А., Валеев Т.К.* Экспериментальные данные по гигиеническому нормированию агидола-21 в атмосфере населённых мест // Токсикологический вестник, 20– № – С. 61-65.
3. *Сулейманов Р.А., Рашитова Г.С., Фархутдинова Ф.С., Валеев Т.К.* Обоснование ориентировочного безопасного уровня воздействия основания Манниха в атмосферном воздухе //Гигиена и санитария. – 20– № – С. 34-
4. *Сулейманов Р.А., Валеев Т.К.* Гигиеническое обоснование предельно-допустимой концентрации Агидола-10 в атмосферном воздухе населенных мест /Гигиена и санитария. – 20– № – С. 95-97.
5. Временные методические указания по обоснованию ПДК загрязняющих веществ в атмосферном воздухе населенных мест. – М., 1989.
6. Методические указания к постановке исследований по изучению раздражающих свойств и обоснованию ПДК избирательно действующих раздражающих веществ в воздухе рабочей зоны. – № 2196-– М., 1980.
7. Методические указания к постановке исследований по обоснованию предельно допустимых концентраций промышленных химических аллергенов в воздушной среде (рабочая зона и атмосфера). – М., 1991.
8. Методы экспериментального исследования по становлению порогов действия промышленных ядов на генеративную функцию с целью гигиенического нормирования (Методические указания). – № 1744-– М., 1978.
9. Определение Агидола-110 в атмосферном воздухе методом жидкостной хроматографии: Методические указания. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 20– 16 с.

REFERENCES:

1. *Rashitova G.S., Suleymanov R.A., Valeev T.K.* Sravnenie ostroy toksichnosti veshchestv klassa alkilfenolov //Hygiene and sanitation, 20– № – S. 80-81 (in Russian).
2. *Suleymanov R.A., Valeev T.K.* Eksperimental'nye dannye po gigienicheskomu normirovaniyu agidola-21 v atmosfere naselennykh mest //Toxicological Revlew, 20– № – S. 61-65 (in Russian).
3. *Suleymanov R.A., Rashitova G.S., Farkhutdinova F.S., Valeev T.K.* Obosnovanie orientirovochnogo bezopasnogo urovnya vozdeystviya osnovaniya Mannikha v atmosfernom vozdukhe // Hygiene and sanitation. – 20– № – S. 34-36 (in Russian).
4. *Suleymanov R.A., Valeev T.K.* Gigienicheskoe obosnovanie predel'no-dopustimoy kontsentratsii Agidola-10 v atmosfernom vozdukhe naselennykh mest //Hygiene and sanitation. – 20– № – S. 95-97 (in Russian).
5. Vremennye metodicheskie ukazaniya po obosnovaniyu PDK zagryaznyayushchikh veshchestv v atmosfernom vozdukhe naselennykh mest. – M., 1989 (in Russian).
6. Metodicheskie ukazaniya k postanovke issledovaniy po izucheniyu razdrazhayushchikh svoystv i obosnovaniyu PDK izbiratel'no deystvuyushchikh razdrazhayushchikh veshchestv v vozdukhe rabochey zony. – № 2196-– M., 1980 (in Russian).
7. Metodicheskie ukazaniya k postanovke issledovaniy po obosnovaniyu predel'no dopustimykh kontsentratsiy promyshlennykh khimicheskikh allergenov v vozdushnoy srede (rabochaya zona i atmosfera). – M., 1991 (in Russian).
8. Metody eksperimental'nogo issledovaniya po stanovleniyu porogov deystviya promyshlennykh yadov na generativnuyu funktsiyu s tsel'yu gigienicheskogo normirovaniya (Metodicheskie ukazaniya). – № 1744-– M., 1978 (in Russian).
9. Opredelenie Agidola-110 v atmosfernom vozdukhe metodom zhidkostnoy khromatografii: Metodicheskie ukazaniya. – M.: Federal'nyy tsentr gigieny i epidemiologii Rospotrebnadzora, 20– 16 s (in Russian).

T.K. Valeev, R.A. Sulejmanov, I.M. Nigmatullin, A.A. Gaysin, N.R. Rahmatullin

MATERIALS OF EXPERIMENTAL STUDIES ON TOXOCITY AND SUBSTANTIATION OF MAXIMUM ALLOWABLE CONCENTRATION OF PHENOZAN-23 IN ATMOSPHERIC AIR OF RESIDENTIAL AREAS

Ufa Research Institute of Occupational Health and Human Ecology , 450106 Ufa, Russian Federation

Toxicological properties and main biological action mechanisms of a new chemical compound Phenozan-23 (Ph-23) belonging to alkylphenol class were studied in laboratory animals. Based on the outcome of experimental studies, toxicometric parameters of Phenozan-23 were stated, its maximum concentration levels in ambient air were substantiated. Test objects were laboratory animals including rabbits, guinea pigs, white rats, white mice. The chemical compound was Phenozan-23.

Keywords: *toxicity, experimental studies, laboratory animals, PH-23.*

Переработанный материал поступил в редакцию 12.08.2015 г.

ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ ТОКСИКОЛОГИЯ

УДК 546.7 : 574.58

ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ТОКСИЧНЫХ МЕТАЛЛОВ С БИОМАССОЙ ОДНОКЛЕТОЧНЫХ ВОДОРОСЛЕЙ МЕТОДОМ ICP-MS

Т.Н. Лубкова, В.В. Пухов, Т.В. Шестакова, И.В. Тропин, С.В. Котелевцев, С.А. Остроумов

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», 119991, г. Москва, Российская Федерация

Токсичные металлы входят в число загрязняющих веществ, наиболее опасных для водных экосистем. Взаимодействия меди и других тяжелых металлов с биомассой водорослей, представляют интерес для экологии и биотехнологии. В этой статье сообщается об изучении взаимодействия уникальной одноклеточной экстремофильной (термофильной, ацидофильной) водоросли *Galdieria sulphuraria* с металлами в водной среде. Этот одноклеточный эукариотный организм обнаружен в горячих (геотермальных) источниках. В настоящей работе изложены результаты экспериментов с биомассой этого организма. Для измерения концентрации тяжелых металлов использовали метод ICP- MS (масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой). Этим методом была обнаружена биосорбция некоторых токсичных металлов биомассой этого организма после инкубации в водной среде с добавленными металлами. Биосорбции свинца и никеля из водной среды не обнаружено. При изучении витрифицированной мортмассы (высушенной биомассы) этого организма было показано, что эта мортмасса не сорбирует медь, свинец или никель. Результаты представляют интерес для разработки новых биотехнологий очищения среды от токсичных металлов.

***Ключевые слова**: биосорбция, водоросли, Galdieria sulphuraria, металлы, кобальт, цинк, никель, кадмий, медь, свинец, биомасса, ICP-MS*

Введение. Тяжелые металлы обладают выраженной токсичностью [1,2] и являются опасными загрязнителями водной среды [3]. Задачи химической безопасности делают необходимой разработку научных основ новых технологий снижения загрязнения водной среды тяжелыми металлами. Одним из направлений поиска новых экологических биотехнологий является изучение способности биомассы различного происхождений сорбировать и тем самым удалять из водной среды

Лубкова Татьяна Николаевна (Lubkova Tat'yana Nikolayevna), ст.н.с. МГУ им. М.В.Ломоносова, 119991, г. Москва, Российская Федерация, ar55@yandex.ru
Пухов Валерий Викторович (Pukhov Valeriy Viktorovich), зав отделом МГУ им. М.В.Ломоносова, 119991, г. Москва, Российская Федерация, ar55@yandex.ru
Шестакова Татьяна Владимировна (Shestakova Tat'yana Vladimirovna), кандидат химических наук, старший научный сотрудник МГУ им. М.В.Ломоносова, 119991, г. Москва, Российская Федерация, ar55@yandex.ru
Тропин Иван Владимирович (Tropin Ivan Vladimirovich), кандидат биологических наук, старший научный сотрудник МГУ им. М.В.Ломоносова, 119991, г. Москва, Российская Федерация, ar55@yandex.ru
Котелевцев Сергей Васильевич (Kotelevtsev Sergey Vasil'yevich), доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник МГУ им. М.В.Ломоносова, 119991, г. Москва, Российская Федерация, ar55@yandex.ru
Остроумов Сергей Андреевич (Ostroumov Sergey Andreyevich), доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник МГУ им. М.В.Ломоносова, 119991, г. Москва, Российская Федерация, ar55@yandex.ru

токсичные загрязняющие вещества, в том числе тяжелые металлы. Активно изучается сорбция тяжелых металлов биомассой растительного происхождения, включая биомассу водорослей [4].

Изучение взаимодействий металлов с водорослями из экстремальных местообитаний (горячих источников) представляет интерес и для познания адаптаций к неблагоприятным экологическим условиям, и с точки зрения экологической биотехнологии [4]. Данная работа представляет собой развитие этих исследований. Для изучения возможности сорбции металлов биомассой был использован ранее недостаточно изученный биологический объект – красная экстремофильная водоросль *Galdieria sulphuraria* (Galdieri) Merola.

Этот уникальный вид водных организмов обнаружен в экосистемах горячих источников (hot springs and geothermal habitats) с низкими значениями pH водной среды. Особенности этого вида водорослей охарактеризованы [5-9].

В предыдущих работах нами исследовались вопросы биосорбции химических элементов образцами биомассы других водных организмов, а именно высших водных растений [10,11].

Целью проведенной работы было расширить круг изучаемых видов водных организмов (источников получения биомассы) и проверить, возможна ли биосорбция некоторых тяжелых металлов биомассой водорослей *Galdieria sulphuraria*, используя высокочувствительный метод масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (ИСП-МС) (ICP-MS) [12].

Материалы и методы исследования.

1.1. Выращивание водорослей с целью получения биомассы.

Культуру клеток красных водорослей *Galdieria sulphuraria* выращивали в среде Аллена (M. Allen) [9], в качалке (90 об/мин) при температуре 34°C при освещении белым светом (60 мкЕ/м^2, фотопериод 10 ч свет: 14 ч темнота). Среду Аллена перед стерилизацией подкисляли серной кислотой до pH 2.6 . Исходная концентрация клеток водорослей в водной среде составляла 1 миллион на 1 мл. Клетки водорослей осаждали из суспензии центрифугированием при 4 тыс. об/мин 15 минут.

Инкубация в водной среде с повышенным содержанием металлов.

Инкубацию проводили 90 мин в водной среде с добавками металлов при 24°C. Для приготовления многоэлементного раствора для инкубации использовали бидистиллированную воду и аттестованные стандартные образцы металлов. Окончательный pH раствора 2,4. Расчетные концентрации металлов в растворе:

медь, цинк – 2 мг/л; кобальт, никель – 0,2 мг/л; кадмий, свинец – 0,1 мг/л.

В полученном растворе содержание металлов анализировали методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (ИСП-МС). Результаты анализа: Cu 1,854 ppm; Zn 2,174 ppm; Co 0,186 ppm; Ni 0,192 ppm; Cd 0,092 ppm; Pb 0,102 ppm.

Концентрации металлов были выбраны с учетом степени относительной токсичности металлов и возможного наличия этих металлов в загрязненной воде водных экосистем.

Пробоподготовка образцов для дальнейших измерений концентрации химических элементов.

В ходе проведения экспериментов получено четыре образца биомассы, которые были высушены до постоянного веса при 80°C в сушильном шкафу, а затем проведено озоление с добавкой двух капель концентрированной азотной кислоты сначала на плитке, а затем в муфеле (muffle) при 450°C в течение двух часов. Полученная после озоления зола твердых образцов была переведена в раствор методом кислотного выщелачивания (acid leaching) (концентрированная HCl, концентрированная HNO_3 и 1:1 H_2SO_4). Пробы после их разложения были перенесены в стерильные центрифужные мерные пробирки и доведены бидистиллированной водой до фиксированного объема.

Использованы образцы мортмассы, полученные из биомассы путем высушивания до постоянного веса (температура 90°C, 4 ч). Перед высушиванием образцы хранились около 1,5 мес. в холодильнике при -15°C. Высушенные образцы имели вид темно-коричневой витрифицированной (стекловидной) массы. Ее растирали пестиком в фарфоровой ступке в порошок перед проведением инкубации.

Измерения методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (ИСП-МС, ICP-MS).

Применявшийся в экспериментах метод измерения – метод масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (ИСП-МС, ICP-MS) – описан ранее [12]. Растворы были подготовлены для анализа методом ИСП-МС. Проведено разбавление по массе 3% азотной кислотой о.с.ч. и добавлен раствор индия (Indium ICP Standard CertiPUR 1002 мг/л +/-0,4%)» в качестве внутреннего стандарта (концентрация индия в каждой пробе составила 10 ppb). Измерения проводились с использованием масс-спектрометра высокого разрешения с индуктивно-связанной плазмой ELEMENT-2 фирмы Thermo Finnigan (Германия). Для калибровки прибора использовался мультиэлементный стандарт для ICP-MS (набор ICP-MS-68A, «High-Purity Standards», США). Относительное стандартное отклонение (по результатам 9 анализов каждой пробы прибором ELEMENT2) составило в среднем для Cu – 1,16%,

Pb – 1,31%, Zn – 0,87%, Cd – 7,83%, Co – 1,68%, Ni – 5,64%.

Результаты и обсуждение. В результате проведенной работы были измерены концентрации нескольких тяжелых металлов – цинка, меди, кобальта, кадмия, свинца и никеля – в образцах биомассы изученных водорослей *Galdieria sulphuraria*. Результаты измерения химических элементов в этих образцах водорослей, полученные с помощью метода ICP-MS, представлены в таблице 1.

Из таблицы 1 видно, что после инкубации концентрация меди, цинка и кобальта в биомассе значительно увеличилась. Прироста концентрации этих элементов (иммобилизации) в мортмассе не наблюдалось. Прироста концентрации других элементов – свинца, кадмия, никеля – в биомассе или мортмассе не выявлено. Содержание меди в образцах биомассы было также измерено другим методом (инверсионная вольтамперометрия), который подтвердил увеличение концентрации этого металла в биомассе после инкубации в водном растворе металлов.

Прирост концентрации некоторых металлов (меди, цинка, кобальта) в биомассе свидетельствует о способности биомассы к биосорбции этих металлов из водной среды, что означает соответствующее уменьшение содержания этих химических элементов в водной среде. Именно это представляет особый интерес для разработки научных основ экологических биотехнологий очищения водной среды от загрязняющих ее химических веществ [4,6,8].

Полученные результаты измерений дополняют и детализируют представления о многофункциональном (multifunctional) участии живых организмов в детоксицирующей системе биосферы [13-16], конкретизируют положения теории биотического самоочищения воды в экосистемах [17].

Полученные результаты интересно сопоставить с данными экспериментов других авторов, проведенных на других биологических объектах с целью выявления способности биомассы к биосорбции металлов из водной среды [18-24]. Так, сорбция меди биомассой водорослей была показана на нескольких видах [18-21], в том числе при изучении следующих водорослей: *Sargassum* sp. [18, 19, 21], *Padina* sp. [18], *Fucus spiralis* [20], *Ascophyllum nodosum* [20]. Показана сорбция свинца биомассой ряда видов водорослей, в том числе: *Sargassum* sp. [18], *Padina* sp. [18], *Fucus vesiculosus* [24] и др. Способность сорбировать цинк показана для биомассы следующих видов водорослей: *Sargassum* sp. [18]; *Padina* sp. [18]; *Fucus spiralis* [20]; *Ascophyllum nodosum* [20]; *Sargassum lipendula* [22]; *Macrocystis pyrifera* [23];

Установлена биосорбция металлов биогенным материалом и других видов организмов (например [10, 11, 15], а также [25-28]).

Результаты измерения содержания химических элементов в биомассе водоросли *Galdieria sulphuraria* показывают следующий важный факт. Выявилось, что в условиях проведенной инкубации не было универсальной, тотальной биосорбции всех металлов, которые присутствовали в среде инкубации в повышенной концентрации (так, биосорбции никеля, свинца и кадмия в условиях опыта не наблюдали). Выявленные

Таблица 1

Среднее содержание химических элементов в сухом веществе образцов Galdieria sulphuraria после и без инкубации, по результатам измерений методом ICP-MS .

№	Образцы материала (водоросли Galdieria sulphuraria), в которых измеряли содержание химических элементов	Zn	Cu	Co	Ni	Pb	Cd
1	Биомасса водорослей Galdieria sulphuraria после инкубации	12	7,0	7,4	0,49	0,54	< 0,01
2	Биомасса водорослей Galdieria sulphuraria без инкубации (контроль)	6	0,8	1,4	1,2	0,55	0,071
3	Мортмасса водорослей Galdieria sulphuraria после инкубации	23	5	0,32	0,28	< 0,04	< 0,01
4	Мортмасса водорослей Galdieria sulphuraria без инкубации (контроль)	12	10	0,32	0,45	< 0,04	< 0,01

Примечание: Измерения химических элементов проводили девять раз, в таблице приведены средние значения. Относительное стандартное отклонение указано в методической части статьи. Единицы измерений концентраций элементов: ppm (мкг/г)

авторами отличия в поведении металлов и их совершенно различная подверженность биосорбции указывают на то, что существуют индивидуальные особенности химических элементов в их взаимодействии с биомассой и мортмассой растительных организмов (на примере водоросли *Galdieria sulphuraria*).

Выводы. Проведенная работа позволяет заключить следующее.

1. Впервые с помощью метода ICP MS выявлена и охарактеризована возможность биосорбции таких токсичных металлов, как медь, цинк и кобальт (Cu, Zn, Co) биомассой одноклеточной термофильной красной водоросли *Galdieria sulphuraria*. Установлено, что биомасса водорослей этого вида иммобилизует эти элементы после инкубации в водной среде с добавленными тяжелыми металлами. В водную среду инкубации биомассы добавляли также никель, кадмий и свинец, но биосорбции этих элементов из водной среды в условиях опыта не обнаружено.

2. При изучении витрифицированной мортмассы водоросли *Galdieria sulphuraria* методом ICP-MS было показано, что в условиях эксперимента не наблюдалось сорбции на этой мортмассе изучавшихся элементов.

3. Полученные результаты измерений дополняют и детализируют теорию полифункциональном участии живых организмов в детоксицирующей системе биосферы [16] и водных экосистем [17].

4. Новые факты об биосорбции металлов (на примере цинка, кобальта, меди) биомассой водорослей (в том числе на примере водоросли *Galdieria sulphuraria*) вносят вклад в разработку вопросов химико-биотических взаимодействий в биосфере [3,11,14-17], а также вопросов биотехнологии очищения водной среды [4], экологической и химической безопасности [2].

Благодарность. Авторы благодарят коллег за советы и рекомендации. Авторы благодарят сотрудника Российской академии наук (РАН) за культуру красной водоросли *Galdieria sulphuraria*. Благодарим сотрудников Института геохимии и аналитической химии им. В.И.Вернадского РАН за обсуждение затронутых вопросов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Курляндский Б. А., Филов В. А.* Общая токсикология. – М.: Медицина. 2002. – 307 с.
2. *Трахтенберг И. М., Тычинин В. А., Галакин Ю. Н.* Экспериментальные данные к анализу воздействий на организм тяжелых металлов. // Токсикологический вестник. – 1994.- №4. – С. 27-31.
3. *Моисеенко Т. И.* Водная экотоксикология. – М.: Наука. 2009. – 400 с.
4. *He J., Chen J. P.* A comprehensive review on biosorption of heavy metals by algal biomass: Materials, performances, chemistry, and modeling simulation tools. // Bioresource Technology. – 2014. – V.160. – P. 67-78.
5. *Schönknecht G., Chen W. H., Ternes C. M., Barbier G. G., Shrestha R. P., Stanke M., Bräutigam A., Baker B.J., Banfield J.F., Garavito R.M., Carr K., Wilkerson C., Rensing S.A., Gagneul D., Dickenson N.E., Oesterhelt C., Lercher M.J., Weber A. P.* Gene transfer from bacteria and archaea facilitated evolution of an extremophilic eukaryote. // Science. – 2013. – V. 339 (6124). – P. 1207-1210.
6. *Minoda A., Sawada H., Suzuki S., Miyashita S. I., Inagaki K., Yamamoto T., Tsuzuki M.* Recovery of rare earth elements from the sulfothermophilic red alga Galdieria sulphuraria using aqueous acid. // Appl. Microbiol. Biotechnol. -2015. – V.99(3) . – P. 1513-15
7. *Selvaratnam T., Pegallapati A. K., Reddy H., Kanapathipillai N., Nirmalakhandan N., Deng S., Lammers P. J.* Algal biofuels from urban wastewaters: Maximizing biomass yield using nutrients recycled from hydrothermal processing of biomass. // Bioresource Technology. – 2015. – V.182. – P. 232-238.
8. *Selvaratnam T., Pegallapati A. K., Montelya F., Rodriguez G., Nirmalakhandan N., Van Voorhies W., Lammers P. J.* Evaluation of a thermotolerant acidophilic alga, Galdieria sulphuraria, for nutrient removal from urban wastewaters. // Bioresource Technology. – 2014. – V. 156. – P. 395-399.
9. *Allen M. B.* Studies with Cyanidium caldarium, an anomalously pigmented chlorophyte. // Arch. Mikrobiol. -1959. – V.32. – P. 270-277.
10. *Ostroumov S.* A, Kolesov G. M. The aquatic macrophyte Ceratophyllum demersum immobilizes Au nanoparticles after their addition to water. // Doklady Biological Sciences. – 2010. – V.431. – P. 124–127.
11. *Johnson M.E., Ostroumov S.A., Tyson J.F., Xing B.* Study of the interactions between Elodea canadensis and CuO nanoparticles. // Russian Journal of General Chemistry. – 2011. – V.№ 13. – P. 2688-26
12. *Лубкова Т. Н., Яблонская Д. А., Шестакова Т. В., Пухов В. В.* Геохимические особенности состава поверхностных вод Находкинского медно-порфирового рудного поля, Чукотка // Вода: химия и экология. – 2013.- № 12. – С. 29-34.
13. *Ostroumov S.A., Shestakova T.V.* Decreasing the measurable concentrations of Cu, Zn, Cd, and Pb in the water of the experimental systems containing Ceratophyllum demersum: The phytoremediation potential. // Doklady Biological Sciences. – 2009. – V.428. – P. 444-4
14. *Ostroumov S.A.* Studying the fate of pollutants in the environment: binding and immobilization of nanoparticles and chemical elements. // Ecologica. – 2011. – V.18, No. 62. – P. 129-1
15. *Остроумов С. А., Колесов Г. М., Котелевцев С. В., Моисеева Ю. А., Казаков Г. Ю.* К изучению тяжелых металлов (включая хром и кобальт) в модельной водной экосистеме с использованием нейтронно-активационного анализа // Токсикологический вестник. – 2010. – № 6. – С. 53-56.
16. *Остроумов С. А.* Обезвреживание токсичных элементов в биосфере и совершенствование экологического мониторинга. // Экология промышленного производства. – 2012. – № 1. – С. 26–32.
17. *Ostroumov S.A.* On the Biotic Self-purification of Aquatic Ecosystems: Elements of the Theory. // Doklady Biological Sciences. – 2004. – V.396. – P. 206-2
18. *Sheng P.X., Ting Y.*-P., Chen J.P., Hong L. Sorption of lead, copper, cadmium, zinc, and nickel by marine algal biomass: characterization of biosorptive capacity and investigation of mechanisms. // J. Colloid Interface Sci. – 2004. – V.275. – P. 131–141.
19. *Sheng P.X., Ting Y.*-P., Chen J.P. Biosorption of heavy metal ions (Pb, Cu, and Cd) from aqueous solutions by the marine alga Sargassum sp. in single- and multiple-metal systems // Ind. Eng. Chem. Res. – 2007. – V.46. – P. 2438–2444.
20. *Romera E., González F., Ballester A., Blázquez M.L., Muñoz J.A.* Comparative study of biosorption of heavy metals using different types of algae // Bioresour. Technol.- 2007. – V.98. – P. 3344–3353.
21. *Kleinübing S.J., da Silva E.A., da Silva M.G.C., Guibal E.* Equilibrium of Cu(II) and Ni(II) biosorption by marine alga Sargassum filipendula in a dynamic system: competitiveness and selectivity // Bioresour. Technol. – 2011. – V.102. – P. 4610–4617.
22. *Luna A.S., Costa A.L.H., da Costa A.C.A., Henriques C.A.* Competitive biosorption of cadmium(II) and zinc(II) ions from binary systems by Sargassum filipendula. // Bioresour. Technol. – 2010. – V.101 (14). – P. 5104–5111.
23. *Plaza Cazón J., Bernardelli C., Viera M., Donati E., Guibal E.* Zinc and cadmium biosorption by untreated and calcium-treated Macrocystis pyrifera in a batch system // Bioresour. Technol. – 2012. – V.116. – P. 195–203.
24. Mata Y.N., Blázquez M.L., Ballester A., González F., Muñoz J.A. Characterization of the biosorption of cadmium, lead and copper with the brown alga Fucus vesiculosus. // J. Hazard. Mater. – 2008. – V.158. – P. 316–323.
25. *Fomina M., Gadd G.M.* Biosorption: current perspectives on concept, definition and application // Bioresource Technology. – 2014. – V.160. – P. 3-14.
26. *Park D., Yun Y.S., Park J.M.* The past, present, and future trends of biosorption. // Biotechnology and Bioprocess Engineering. – 2010. – V. 15. – P. 86-102.
27. *Gadd G.M.* Biosorption: critical review of scientific rationale, environmental importance and significance for pollution treatment. // Journal of Chemical Technology and Biotechnology. -2009. – V.84. – P. 13-28.
28. *Wang J., Chen C.* Biosorbents for heavy metals removal and their future. // Biotechnology Advances. – 2009. – V.27. – P.195-226.
29. *Хамидулина Х. Х., Курляндский Б. А.* 20-летний опыт информационно-аналитической деятельности ФБУЗ «Российский регистр потенциально опасных химических и биологических веществ» Роспотребнадзора. // Токсикологический вестник. – 2012.- № 6. – С.2-5.

REFERENCES:

1. *Kurlyandskiy B. A., Filov V.A.* General toxicology [Obshchaya toksikologiya]. – Moscow: Meditsina. 2002. – 307 s. (in Russian).
2. *Trakhtenberg I. M., Tychinin V. A., Galakin Yu. N.* Experimental data for the analysis of effects heavy metals on the organism [Eksperimental'nye dannye k analizu vozdeystviy na organizm tyazhelykh metallov]. // Toksikologicheskiy vestnik. – 1994.- №4. – S. 27-31. (in Russian).
3. *Moiseenko T.I.* Aquatic Ecotoxicology [Vodnaya ekotoksikologiya]. – Moscow: Nauka. 2009. – 400 pages. (in Russian).
4. *He J., Chen J. P.* A comprehensive review on biosorption of heavy metals by algal biomass: Materials, performances, chemistry, and modeling simulation tools. // Bioresource Technology. – 2014. – V.160. – P. 67-78.
5. *Schönknecht G., Chen W. H., Ternes C. M., Barbier G. G., Shrestha R. P., Stanke M., Bräutigam A., Baker B.J., Banfield J.F., Garavito R.M., Carr K., Wilkerson C., Rensing S.A., Gagneul D., Dickenson N.E., Oesterhelt C., Lercher M.J., Weber A. P.* Gene transfer from bacteria and archaea facilitated evolution of an extremophilic eukaryote. // Science. – 2013. – V. 339 (6124). – P. 1207-1210.
6. *Minoda A., Sawada H., Suzuki S., Miyashita S. I., Inagaki K., Yamamoto T., Tsuzuki M.* Recovery of rare earth elements from the sulfothermophilic red alga Galdieria sulphuraria using aqueous acid. // Appl. Microbiol. Biotechnol. -2015. – V.99(3) . – P. 1513-15
7. *Selvaratnam T., Pegallapati A. K., Reddy H., Kanapathipillai N., Nirmalakhandan N., Deng S., Lammers P. J.* Algal biofuels from urban wastewaters: Maximizing biomass yield using nutrients recycled from hydrothermal processing of biomass. // Bioresource Technology. – 2015. – V.182. – P. 232-238.
8. *Selvaratnam T., Pegallapati A. K., Montelya F., Rodriguez G., Nirmalakhandan N., Van Voorhies W., Lammers P. J.* Evaluation of a thermo-tolerant acidophilic alga, Galdieria sulphuraria, for nutrient removal from urban wastewaters. // Bioresource Technology. – 2014. – V. 156. – P. 395-399.
9. *Allen M. B.* Studies with Cyanidium caldarium, an anomalously pigmented chlorophyte. // Arch. Mikrobiol. -1959. – V.32. – P. 270-277.
10. *Ostroumov S.* A, Kolesov G. M. The aquatic macrophyte Ceratophyllum demersum immobilizes Au nanoparticles after their addition to water. // Doklady Biological Sciences. – 2010. – V.431. – P. 124–127.
11. *Johnson M.E., Ostroumov S.A., Tyson J.F., Xing B.* Study of the interactions between Elodea canadensis and CuO nanoparticles. // Russian Journal of General Chemistry. – 2011. – V.№ 13. – P. 2688-26
12. *Lubkova T.N., Yablonskaya D.A., Shestakova T.V., Pukhov V.V.* Geochemical characteristics of surface waters of the Nakhodka copper-porphyry ore field, Chukotka Peninsula [Geokhimicheskie osobennosti sostava poverkhnostnykh vod Nakhodkinskogo medno-porfirovogo rudnogo polya, Chukotka] // Voda: khimiya i ekologiya. – 2013.- № 12. – S. 29-34. (in Russian).
13. *Ostroumov S.A., Shestakova T.V.* Decreasing the measurable concentrations of Cu, Zn, Cd, and Pb in the water of the experimental systems containing Ceratophyllum demersum: The phytoremediation potential. // Doklady Biological Sciences. – 2009. – V.428. – P. 444-4
14. *Ostroumov S.A.* Studying the fate of pollutants in the environment: binding and immobilization of nanoparticles and chemical elements. // Ecologica. – 2011. – V.18, No. 62. – P. 129-1
15. *Ostroumov S.A., Kolesov G.M., Kotelevtsev S.V., Moiseeva Yu.A., Kazakov G.Yu.* On studying heavy metals (including chromium and cobalt) in a model aquatic ecosystem using neutron activation analysis [K izucheniyu tyazhelykh metallov (vklyuchaya khrom i kobal't) v model'noy vodnoy ekosisteme s ispol'zovaniem neytronno-aktivatsionnogo analiza] // Toksikologicheskiy vestnik. – 2010. – № 6. – S. 53-56. (in Russian).
16. *Ostroumov S. A.* Detoxification of toxic elements in the biosphere and improving environmental monitoring. [Obezvrezhivanie toksichnykh elementov v biosfere i sovershenstvovanie ekologicheskogo monitoring]. // Ekologiya promyshlennogo proizvodstva. – 2012. – № 1. – S. 26–32. (in Russian).
17. *Ostroumov S.A.* On the Biotic Self-purification of Aquatic Ecosystems: Elements of the Theory. // Doklady Biological Sciences. – 2004. – V.396. – P. 206-2
18. *Sheng P.X., Ting Y.*-P., Chen J.P., Hong L. Sorption of lead, copper, cadmium, zinc, and nickel by marine algal biomass: characterization of biosorptive capacity and investigation of mechanisms. // J. Colloid Interface Sci. – 2004. – V.275. – P. 131–141.
19. *Sheng P.X., Ting Y.*-P., Chen J.P. Biosorption of heavy metal ions (Pb, Cu, and Cd) from aqueous solutions by the marine alga Sargassum sp. in single- and multiple-metal systems // Ind. Eng. Chem. Res. – 2007. – V.46. – P. 2438–2444.
20. *Romera E., González F., Ballester A., Blázquez M.L., Muñoz J.A.* Comparative study of biosorption of heavy metals using different types of algae // Bioresour. Technol.- 2007. – V.98. – P. 3344–3353.
21. *Kleinübing S.J., da Silva E.A., da Silva M.G.C., Guibal E.* Equilibrium of Cu(II) and Ni(II) biosorption by marine alga Sargassum filipendula in a dynamic system: competitiveness and selectivity // Bioresour. Technol. – 2011. – V.102. – P. 4610–4617.
22. *Luna A.S., Costa A.L.H., da Costa A.C.A., Henriques C.A.* Competitive biosorption of cadmium(II) and zinc(II) ions from binary systems by Sargassum filipendula. // Bioresour. Technol. – 2010. – V.101 (14). – P. 5104–5111.
23. *Plaza Cazón J., Bernardelli C., Viera M., Donati E., Guibal E.* Zinc and cadmium biosorption by untreated and calcium-treated Macrocystis pyrifera in a batch system // Bioresour. Technol. – 2012. – V.116. – P. 195–203.
24. Mata Y.N., Blázquez M.L., Ballester A., González F., Muñoz J.A. Characterization of the biosorption of cadmium, lead and copper with the brown alga Fucus vesiculosus. // J. Hazard. Mater. – 2008. – V.158. – P. 316–323.
25. *Fomina M., Gadd G.M.* Biosorption: current perspectives on concept, definition and application // Bioresource Technology. – 2014. – V.160. – P. 3-14.
26. *Park D., Yun Y.S., Park J.M.* The past, present, and future trends of biosorption. // Biotechnology and Bioprocess Engineering. – 2010. – V. 15. – P. 86-102.
27. *Gadd G.M.* Biosorption: critical review of scientific rationale, environmental importance and significance for pollution treatment. // Journal of Chemical Technology and Biotechnology. -2009. – V.84. – P. 13-28.
28. *Wang J., Chen C.* Biosorbents for heavy metals removal and their future. // Biotechnology Advances. – 2009. – V.27. – P.195-226.
29. *Khamidulina Kh.Kh., Kurlyandskiy B.A.* 20 years of experience in information-analytical activity of the FBUZ "Russian Register of Potentially Hazardous Chemical and Biological Substances" of Rospotrebnadzor. [20-letniy opyt informatsionno-analiticheskoy deyatel'nosti FBUZ «Rossiyskiy registr potentsial'no opasnykh khimicheskikh i biologicheskikh veshchestv» Rospotrebnadzora]. // Toksikologicheskiy vestnik. – 2012.- № 6. – P.2-5. (in Russian).

T.N. Lubkova, V.V. Pukhov, T.V. Shestakova, I.V. Tropin, S.V. Kotelevtsev, S.A. Ostroumov

STUDY OF INTERACTIONS OF TOXIC METALS WITH BIOMASS OF UNICELLULAR ALGAE USING THE METHOD OF ICP-MS

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

Toxic metals are among the most important chemical pollutants of aquatic environments. Interaction of copper and other toxic metals with biomass of algae is of interest to modern ecology and biotechnology. In this paper, interactions of the biomass of a unique extremophilic (acidophilic, thermophilic) algae *Galdieria sulphuraria* with copper and other metals in the aquatic environment were studied. This unicellular extremophilic, acidophilic eukaryotic organism is found in hot springs and geothermal habitats. In this paper, results of experiments with the biomass and mortmass of this organism are reported. Measurements were made using the method of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP- MS). Biosorption of copper and some other metals by the biomass of this organism was discovered after incubation in an aquatic medium mingled with these metals. Biosorption (immobilization) of lead and nickel from the aquatic environment was not found out. In experiments with the mortmass of Galdieria sulphuraria no sorption of copper and lead was revealed. The results obtained are useful to develop a new biotechnology for removal of toxic metals from water.

Keywords: *biosorption, algae, Galdieria sulphuraria, metals, cobalt, zinc, nickel, cadmium, copper, lead, biomass, ICP-MS.*

Материал поступил в редакцию 28.04.2015 г.

УДК 574.583:582.263:574.63

ЗАЩИТА ОТ ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ СУЛЬФАТА КАДМИЯ ШУНГИТОМ В НАКОПИТЕЛЬНОЙ КУЛЬТУРЕ МИКРОВОДОРОСЛИ

Г.А. Даллакян, В.И. Ипатова, И.В. Агеева

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», 119991, г. Москва, Российская Федерация

Исследовали комбинированное действие 1,5 мг/л сульфата кадмия и шунгита 100 г/л на развитие культуры зеленой хлорококковой микроводоросли Scenedesmus quadricauda (Turp.) Bréb. Показано, что в присутствии шунгита наблюдается стимуляция роста культуры водорослей, а в присутствии сульфата кадмия, наоборот, происходит полное угнетение ее роста по сравнению с контролем. При комбинированном воздействии сульфата кадмия и шунгита на популяцию Scenedesmus guadricauda токсическое действие сульфата кадмия снимается. Наиболее интенсивный рост культуры происходил, когда в культуральную среду был добавлен только шунгит, при этом эффективность фотосинтеза, численность клеток и доля живых клеток в присутствии шунгита увеличивались. При этом в присутствии шунгита наблюдалось удлинение стационарной фазы роста и более поздний переход культуры к фазе отмирания, т.е. происходило увеличение продолжительности жизни популяции. По-видимому, шунгит в культуральной среде действует, с одной стороны, как сорбент, а, с другой - изменяет окислительно-восстановительное состояние среды, способствуя благоприятному росту культуры. Механизм действия шунгита может быть разный и его можно использовать как универсальное средство для очистки воды от различных загрязняющих веществ.

Ключевые слова: *Scenedesmus guadricauda, сульфат кадмия, 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 и 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. Защита от токсического действия бихромата калия шунгитом показано в нашей предыдущей работе [2]. Природный композит шунгит в основном состоит из аморфного, глобулярного, фуллереноподобного углерода. В Зажогинской 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. [3]. Фуллерен был обнаружен в шунгитах Карелии в 1992 г. [4]. 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 [5,6]. Разнонаправленное действие фуллеренов на биологические объекты объясняется особыми свойствами водных сферических оболочек этих соединений [7].

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

Даллакян Генарис Арменакович (Dallakyan Genaris Armenakovich), кандидат биологических наук, старший научный сотрудник кафедры гидробиологии биологического факультета МГУ им. Ломоносова, 119991, г. Москва, Российская Федерация, honaris@bk.ru
Ипатова Валентина Ивановна (Ipatova Valentina Ivanovna), кандидат биологических наук, старший научный сотрудник кафедры гидробиологии биологического факультета МГУ им. Ломоносова, 119991, г. Москва, Российская Федерация, viipatova@hotmail.com
Агеева Ирина Вадимовна (Ageeva Irina Vadimovna), научный сотрудник кафедры гидробиологии биологического факультета МГУ им. Ломоносова, 119991, г. Москва, Российская Федерация, ageev@phys.chem.msu.ru

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 сульфата кадмия, являющимся одним из сильнодействующих токсикантов. В последние годы кадмий широко используется во многих отраслях промышленности, в следствие чего его содержание в водной среде стало неуклонно расти. Кадмий относят к веществам II класса опасности (как высоко опасные).

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

Материалы и методы исследования. Объектом исследования была альгологически чистая культура Scenedesmus quadricauda (Turp.) Bréb., которую выращивали в конических колбах емкостью 250 мл на среде Успенского № 1 (100 мл) при температуре 25°С и круглосуточном освещении 15 мкмоль квантов $м^{-2}$ $с^{-1}$.

В экспериментах использовали шунгит с Зажогинского месторождения от компании «Арго» и сульфат кадмия ($CdSO_4$), широко используемый в международной практике токсикологических исследований как эталонный токсикант. Шунгит из расчета 100 г/л и сульфат кадмия в концентрации 1,5 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 автоклавировали 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 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. Кривые индукции флуоресценции были построены на основе данных, полученных на приборе «МЕГА-25». Интенсивность флуоресценции хлорофилла была рассчитана по показателям флуоресценции Fo и Fm, [8]. Контролем служил рост водорослей в чистой среде без добавления шунгита и сульфата кадмия.

Эксперименты проводили в трех повторностях длительностью 30 суток. Статистическую обработку результатов проводили в программе Excel-2010 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 г/л), сульфата кадмия (1,5 мг/л) и при их совместном присутствии в культуральной среде (100 г/л шунгита+1,5 мг/л сульфата кадмия).

В присутствии шунгита наблюдали достоверную стимуляцию роста культуры, начиная с 15 суток, по сравнению с ростом контрольной культуры в чистой среде. Одновременно происходило удлинение стационарной фазы роста культуры водорослей и более поздний переход культуры к фазе отмирания, т.е. наблюдалось увеличение продолжительности жизни популяции. Воздействие сульфата кадмия приводило к подавлению роста культуры по сравнению с контролем на протяжении всего 30-суточного эксперимента. При этом, начиная с 5-х суток, клетки практически не делились и численность клеток постепенно уменьшалась за счет их гибели и лизиса.

В наших экспериментах мы исследовали изменение роста культуры при комбинированном воздействии шунгита и сульфата кадмия. При этом наблюдалось значительное отклонение численности клеток от проб с присутствием только сульфата кадмия особенно после 5-х суток опыта, что свидетельствует об инактивации токсического действия сульфата кадмия. Ранее в наших работах [9] было показано, что шунгит защищает от повреждающего действия фотодинамических красителей на популяцию клеток S. quadricauda. При этом шунгит дезактивирует синглетный кислород, образующийся красителелем, и тем самым защищает водоросли от его токсического действия. В этом процессе фуллереноподобные соединения, входящие в состав шунгита, проявляют себя как антиоксиданты [9]. Защита от токсического действия бихромата калия на популяции водорослей показано нами ранее [2]. В присутствии же сульфата кадмия в среде синглетный кислород не образуется. По видимому, инактивация сульфата кадмия происходит за счет образования комплекса с шунгитом, что приводит к снижению концентрации металла в среде и переводу его в неактивную и недоступную для клетки форму. Этот комплекс не может проникнуть в клетку из за большого размера или заряда.

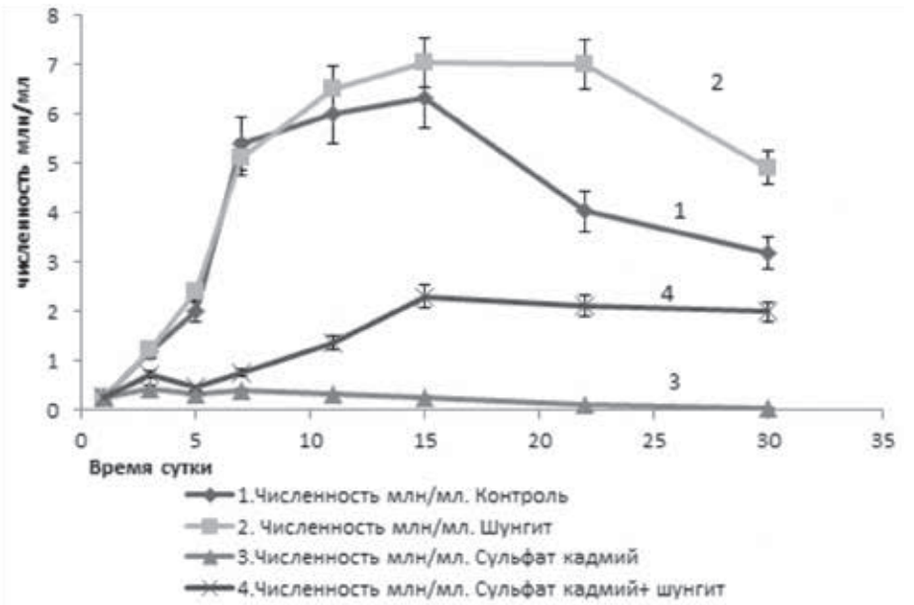


Рис. 1. Влияние шунгита и сульфата кадмия на изменение численности клеток (в млн. кл/мл) Scenedesmus guadricauda

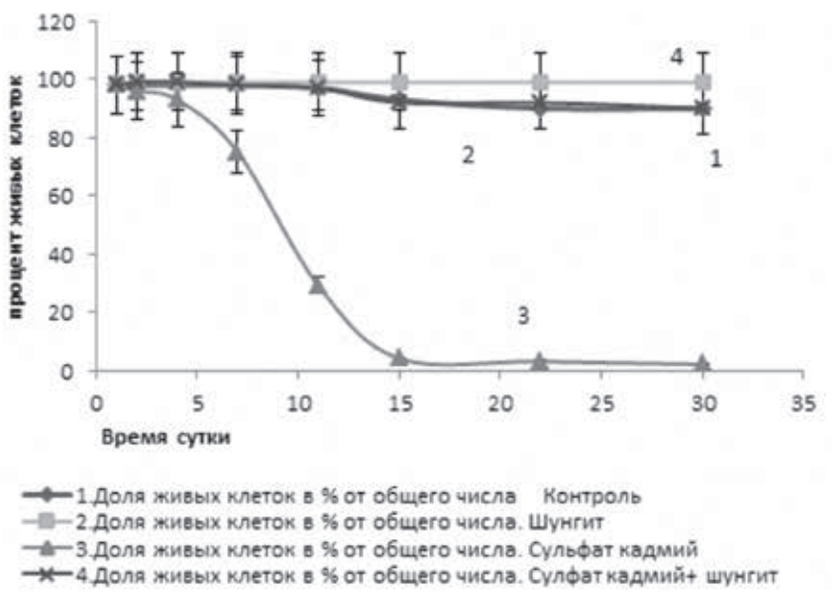


Рис. 2. Доля живых клеток в культуре S. quadricauda (в % от общего количества) в присутствии шунгита и сульфата кадмия.

Стимуляцию роста водоросли в присутствии шунгита после 15 суток роста, по сравнению с ее ростом в чистой среде можно объяснить, в частности, тем, что шунгит восстанавливает различные окислители, сенсибилизаторы и другие соединения, входящие в состав метаболитов, переводя их в неактивное состояние. В присутствии шунгита наблюдалось удлинение стационарной фазы роста и более поздний переход культуры к фазе отмирания, т.е. происходило увеличение продолжительности жизни популяции. 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 С60, который составляет около 0,04 % [10].

На рисунке 2 представлены результаты исследования жизнеспособности клеток S. quadricauda, оцененной с помощью метода люминесцентной микроскопии. В присутствии 1,5 мг/л сульфата кадмия количество живых клеток в культуре со временем постепенно уменьшалось и к 15 суткам составляла около 4 %, а доля мертвых – соответственно со временем увеличивалась. В присутствии шунгита доля живых клеток в культуре была на или выше уровне контроля. При комби-

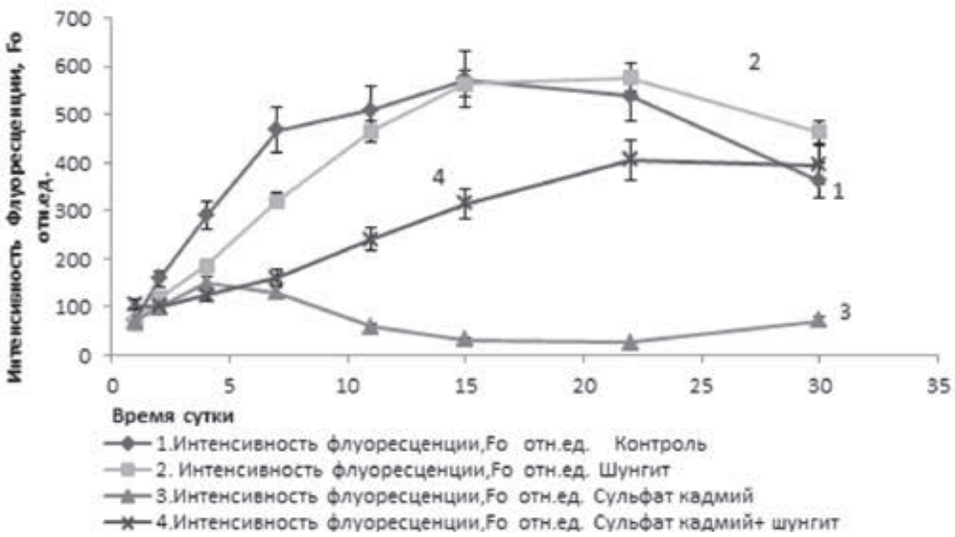


Рис. 3. Изменение интенсивности флуоресценции Fo в процессе развития культуры S. quadricauda в присутствии шунгита и сульфата кадмия.

нированном действии сульфата кадмия и шунгита доля живых клеток составляла 98-99 % на протяжении всего эксперимента и была близка к контролю. Полученные результаты также свидетельствуют о снижении токсического действия сульфата кадмия на культуру S. quadricauda в присутствии шунгита.

Для более детального изучения влияния токсиканта на пигментный состав водорослей были исследованы – начальный уровень флуоресценции (Fo), отражающий содержание пигментов, эффективность фотосинтеза и кинетика флуоресценции [8].

Как видно из рисунка 3, количество пигментов в пробах с шунгитом (3, 4) во время роста культуры всегда меньше, чем в пробах без него (1,2). Это связано с тем, что в пробах (3,4) присутствует сульфат кадмия. При этом в пробе № 4 (шунгит+кадмий) шунгит частично инактивирует действие сульфата кадмия. Подавление флуоресценции (кривая 3) отражает токсическое действие сульфата кадмия. В присутствии токсиканта, начиная с 5-х суток роста, количество пигментов в клетках непрерывно уменьшалось, рост культуры прекращался, а количество живых клеток уменьшалось и составляло около 4% уже на 15 сутки (рис. 1, 2, 3). В экспериментах специально было исследовано влияние высокой концентрации сульфата кадмия 1,5 мг/л (1500 раз выше ПДК) для оценки защитного свойства шунгита. Относительно большее количество пигментов в контрольной пробе до 15 сутки роста культуры по отношению к пробе № 2 связано с тем, что в пробах с шунгитом фаза отмирания культуры сдвигается на более поздний срок, поэтому, начиная с 15 суток, количество пигментов в пробе № 2 становится больше, чем в контроле. Это связано с тем, что в присутствии шунгита клетки S. quadricauda по размеру были меньше, чем в его отсутствии (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, способствовавших благоприятному росту культуры микроводоросли.

На рисунке 4 представлены данные изменения фотохимического квантового выхода фотосистемы II или эффективности фотосинтеза ψ = Fv/Fm (в %), рассчитанной по формуле ψ = (Fm-Fo)/Fm, где Fm – интенсивность флуоресценции при закрытых реакционных центрах фотосистемы II [8]. Данные по эффективности фотосинтеза (рис. 4) хорошо согласуются с данными по общей численности клеток (рис. 1), а также доле живых клеток в культуре (рис. 2). Во всех случаях, как в присутствии шунгита, так и при одновременном присутствии в среде шунгита и сульфата кадмия, 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 сульфата кадмия. Эффективность фотосинтеза была наиболее низкой в пробах с сульфатом кадмия. Близкие значения (в пределах ошибки измерения) эффективности фотосинтеза после 10-х суток роста водорослей во всех остальных 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.

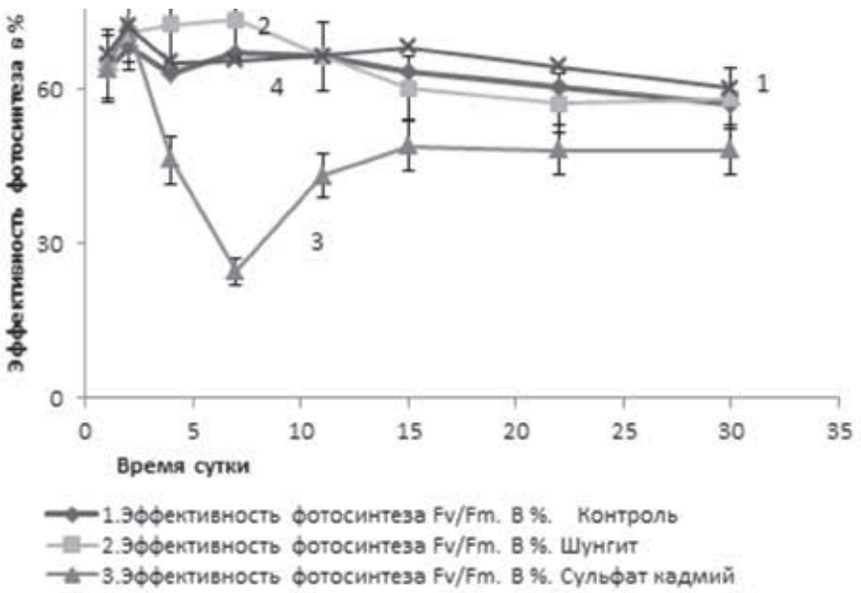


Рис. 4. Эффективность фотосинтеза S. quadricauda в присутствии шунгита и сульфата кадмия.

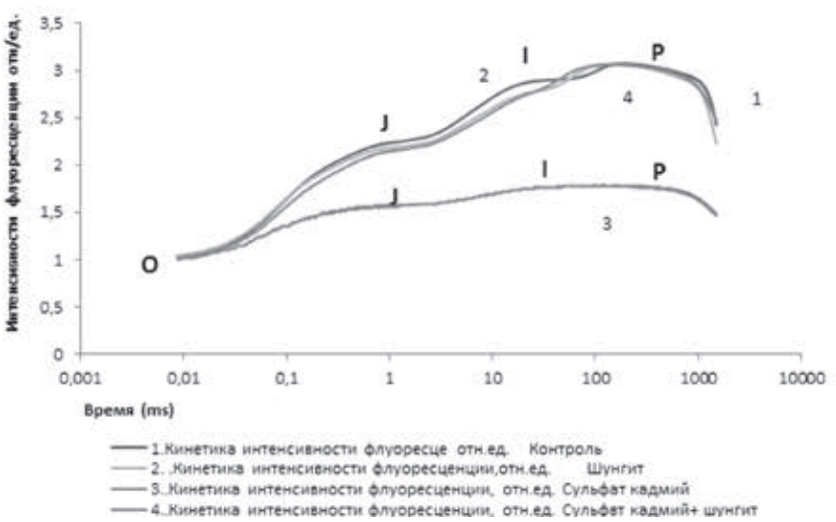


Рис. 5. Кривые индукции флуоресценции хлорофилла на 15 день роста культуры S. guadricauda.

На рисунке 5 показана кинетика индукции хлорофилла на 15 день роста культуры во всех вариантах опыта, поскольку в это время наблюдались значительные отличия по численности клеток и доле живых и мертвых клеток в культуре.

Кинетика так называемых O-J-I-P кривых отражает состояние фотосинтетического аппарата. Эти кривые построены в логарифмической шкале времени в микросекундах (ms). Кривая 3 (рис. 5) свидетельствует о значительном подавлении процесса фотосинтеза в присутствии сульфата кадмия. При этом в других пробах значимых нарушений фотосинтетического аппарата не обнаружено.

Таким образом, различными методами нами было показано, что с помощью шунгита можно инактивировать токсическое действие сульфата кадмия в концентрации, превышающей ПДК рыбохозяйственных водоемов в 1500 раз. Необходимо также отметить, что каждый из способов оценки состояния популяции клеток водоросли, используемых в наших опытах, отражают различные состояния популяции и не могут заменить друг друга, хотя тенденция в реакции водоросли, обнаруженная разными методами, сходна.

Заключение. Значительное ускорение роста культуры S. quadricauda в присутствии шунгита по сравнению с ростом культуры в чистой среде происходит особенно после 15 суток опыта. Стимулирование роста S. quadricauda при комбинированном действии сульфата кадмия и шунгита, по сравнению с ее ростом в присутствии только

сульфата кадмия, возможно, связано с тем, что соединения входящие в природный композит шунгита образуют, комплекс с сульфатом кадмия и инактивируют его действие. Кроме того, фуллереноподобные соединения изменяют свойства воды. Фуллерены плохо растворяются в воде, однако при настаивании в течение нескольких часов вокруг каждого фуллерена образуется многослойная оболочка из молекул воды, которую называют структурированной водой [5, 6], что создает условия для благоприятного роста культуры. Возможно, что во время роста культуры, когда количество экзометаболитов в среде увеличивается, шунгит выступает, и сорбентом метаболитов, инактивируя их ингибирующее действие. Таким образом, в присутствии шунгита происходит увеличение продолжительности жизни накопительной культуры.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Даллакян Г. А.* Рост популяции микроводорослей в условиях питательных сред, обогащенных синглетным кислородом. Известия РАН. Серия биол. 1998; 6: 751-53.
2. *Даллакян Г. А., Погосян С. И., Ипатова В. И., Агеева И. В.* Инактивация токсического действия бихромата калия шунгитом в присутствии микроводорослей. Токсикологический вестник. 2014, 5: 39-44
3. *Каленин Ю. К.* Экологический потенциал шунгита. Наука в России. 2008; 6: 39-44.
4. *Buseck P.R., Tsipursky S.J., Hettich R.* Fullerenes from the geological environment. Science. 1992; 257 (5067): 215-17.
5. *Andrievsky G.V., Bruskov V.I., Tykhomyrov A.A., Gudkov S.V.* Peculiarities of the antioxidant and radioprotective effects of hydrated C60 fullerene nanostuctures in vitro and in vivo. Free Radical Biology Med. 2009; 47: 786–93.
6. *Пиотровский Л. Б., Еропкин М. Ю., Еропкина Е. М., Думпис М. А., Киселев О. И.* Механизмы биологического действия фуллеренов – зависимость от агрегатного состояния. Психофармакол. биол. наркол. 2007; 7(2): 1548-54.
7. *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-Avaible at: http://cyberleninka.ru/article/n/gidratirovannyy-fulleren-kak-instrument-dlya-ponimaniya-roli-osobyh-strukturnyh-svoystv-vodnoy-sredy-zhivogo-organizma-dlya-ego
8. *Погосян С. И., Гальчук С. В., Казимирко Ю. В., Конюхов И. В., Рубин А. Б.* Применение флуориметра «МЕГА-25» для определения количества фитопланктона и оценки состояния его фотосинтетического аппарата. Вода: химия и экология. 2009; 6: 34-40.
9. *Даллакян Г. А., Агеева И. В., Братковская Л. Б.* Влияние шунгита на функциональную активность микроводорослей Scenedesmus quadricauda. Вода: химия и экология. 2013; 10: 102-6.
10. *Осипов Э. В., Калинин Ю. К., Резников В. А.* Способ выделения фуллеренов из шунгита. Патент РФ, № 2270801; 2006

REFERENCES:

1. *Dallakyan G.A.* Population growth of algae in culture media enriched with singlet oxygen. Izvestija RAN. Serija biol. 1998; 6: 751-53 (in Russian).
2. Dallakyan GA, Pogosyan SI Ipatov VI, IV Ageev The inactivation of the toxic effect of potassium dichromate in the presence of schungite microalgae. Toksikologicheskiy vestnik. 2014, 5: 39-44 (in Russian).
3. *Kalenin Ju.K.* Ecological potential of shungit. Nauka v Rossii. 2008; 6: 39-44 (in Russian).
4. *Buseck P.R., Tsipursky S.J., Hettich R.* Fullerenes from the geological environment. Science. 1992; 257 (5067): 215-17.
5. *Andrievsky G.V., Bruskov V.I., Tykhomyrov A.A., Gudkov S.V.* Peculiarities of the antioxidant and radioprotective effects of hydrated C60 fullerene nanostuctures in vitro and in vivo. Free Radical Biology Med. 2009; 47: 786–93.
6. *Piotrovskij L.B., Eropkin M.Ju., Eropkina 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): 1548-54 (in Russian).
7. *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 vedomosti BelGU, Serija Estestvennye nauki. 2012; 9: 122-Avaible at: http://cyberleninka.ru/article/n/gidratirovannyy-fulleren-kak-instrument-dlya-ponimaniya-roli-osobyh-strukturnyh-svoystv-vodnoy-sredy-zhivogo-organizma-dlya-ego (in Russian).
8. *Pogosjan S.I.,* Gal'chuk S.V., Kazimirko Ju.V., Konjukhov I.V., Rubin A.B. Application fluorometer "MEGA-25" to determine the amount of phytoplankton and its assessment of the photosynthetic apparatus. Voda: himija i jekologija. 2009; 6: 34-40 (in Russian).
9. *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: 102-6 (in Russian).
10. *Osipov E. V., Kalinin Ju.K., Reznikov V.A.* The method of separation of fullerenes shungit. Patent RF, N 2270801; 2006 (in Russian).

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

PROTECTION AGAINST THE TOXIC EFFECT OF CADMIUM SULFATE IN THE PRESENCE OF SHUNGITE IN BATCH CULTURE OF MICROALGAE

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

A combined effect of 1.5 mg / l of cadmium sulfate and 100 g / l of shungite on the development of the culture of green chlorococcales microalgae *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Bréb was studied. It is shown that stimulation of algal culture growth was observed in the presence of shungite, and in the presence of cadmium sulfate on the contrary, there is a complete inhibition of its growth as compared to the controls. Under the combined action of cadmium sulfate and shungite on the *Scenedesmus quadricauda,* cadmium sulfate toxic effect disappeared. The most intensive growth of the culture occurred when shungite was only added to the culture medium and herewith in the presence of schungite, the photosynthesis efficiency, number of cells and live cells percentage increased. In the presence of schungite, were observed lengthening of the growth stationary phase and a later transition of the culture to the die-away phase. It means, the population life span lengthens. Apparently, shungite in the culture medium acts as a sorbent on the one hand, and on the other hand alters the medium redox state, contributing to the culture favorable growth. The mechanism of shungite action could be various and it can be used as a universal remedy for purification of water from various pollutants.

Keywords: *Scenedesmus quadricauda*, cadmium sulfate, shungite, cell viability, fluorescence, photosynthesis efficiency.

Материал поступил в редакцию 19.06.2015 г.

ЮБИЛЕЙНЫЕ ДАТЫ

НИКОЛАЙ ВАСИЛЬЕВИЧ ЛАЗАРЕВ – ВЫДАЮЩИЙСЯ ТОКСИКОЛОГ И ФАРМАКОЛОГ

(биография и научная деятельность)
К 120-летию со дня рождения

С.Ф. Вершинина[1], А.Н. Стуков[2], Е.В. Цырлина[2], К.В. Яременко[3]

[1]ФГБУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий» МЗ РФ. 197758, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация.
[2]ФГБУ «Научно исследовательский институт онкологии им. проф. Н.Н. Петрова» МЗ РФ. 197758, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация.
[3]Реабилитационный онкологический центр, 190005, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация.

Николай Васильевич Лазарев родился 2 декабря 1895 г. в Царском Селе. Отец умер, когда Николаю Васильевичу было всего 4 года. Мать после смерти мужа перебралась в Петербург, где работала на швейном предприятии. Однако, не имея возможности содержать двоих детей, отдала Колю в семью своей старшей сестры, муж которой работал начальником Царскосельского вокзала (теперь Витебский вокзал). Семья, в которой было еще шесть детей, занимала большую казенную квартиру в здании вокзала. Среднее образование Николай Васильевич получил в первом петербургском реальном училище на Васильевском острове. Одноклассником Николая Васильевича был Павел Войтик, известный в период Октябрьской революции под именем «Петроградский комиссар» и погибший при подавлении Кронштадтского мятежа в 1918 г. А в 1913 году выпускника Николая Лазарева за дерзкий выпад против директора, ярого монархиста, исключили из училища. Поэтому Николай Лазарев сдавал выпускные экзамены экстерном. В подготовке к экзаменам помогали одноклассники и в их числе будущий известный учёный – академик АН СССР Д. Н.Насонов.

Получив аттестат о среднем образовании, Николай Лазарев устраивается конторщиком в управление железной дороги. Это дает ему право на определенное число бесплатных поездок по стране, что отвечало его мечте о путешествиях. Одновременно усиленно занимается самообразованием и становится постоянным посетителем Петербургской публичной библиотеки (через 50 лет он оказывается в числе её почетных читателей). Дружба со студентом Петербургского университета Алексеем Матвеевым оказала большое влияние на будущую научную деятельность Н.В.Лазарева и на его личную судьбу. В доме Матвеевых он знакомится с блестящими представителями бурно развивающейся физической химии. Глубокая осведомленность в области физической химии послужила основой для его дальнейших научных исследований.

А сестра Алексея Матвеева Аня стала женой Н.В. Лазарева.

Во время Первой мировой войны Николай Лазарев после прохождения кратких курсов по оказанию первой медицинской помощи служит в составе одного из полевых отрядов Красного Креста на Юго-Западном фронте действующей армии, где во время перестрелки получает слепое ранение в живот. К счастью, пуля была благополучно извлечена.

В 1919 году Николай Лазарев вступает добровольцем в Первую Конную армию и получает назначение на должность лекарского помощника. В армии С.М.Буденного эта должность считалась командирской.

Бойцом Первой Конной армии была и Анна Парфеньевна Матвеева. Здесь они регистрируют свой брак и в свидетельстве о браке в графе место жительства значится: Первая конная армия. Впоследствии доктор мед. наук, проф. А.П. Лазарева многие годы работала в Институте онкологии в г. Ленинграде. Ею была разработана методика фракционированного облучения, позволившая впервые достигать полного излечения при раке нижней губы.

В 1921 году штаб Санитарного управления Первой Конной армии удовлетворяет ходатайство Н.В. и А.П. Лазаревых о продолжении медицинского образования. Реввоенсовет первой Кон-

ной армии награждает их почетными грамотами. Они становятся студентами Екатеринославского (Днепропетровского) института.

Еще в студенческие годы Николай Васильевич знакомится с публикациями работающего в Киеве ученого в области патофизиологии и микробиологии Алексея Антониновича Кронтовского. Весной 1922 года Николай Васильевич на паровозе в качестве добровольного помощника машиниста приезжает в Киев, где состоялась его встреча с проф. А.А. Кронтовским. Н.В. Лазарев переводится в Киевский медицинский институт и становится студентом 3 курса этого вуза. Одновременно увлеченно занимается научной работой под руководством проф. А.А Кронтовского.

В 1925 году Н.В. Лазарев оканчивает лечебный факультет Киевского медицинского института и по приглашению А.А.Кронтовского становится сотрудником руководимой им лаборатории. Здесь при участии Николая Васильевича проводятся работы по изучению действия рентгеновского облучения на кровеносные сосуды, изучение поведения злокачественных клеток в культуре. Эти работы были переведены на немецкий язык и опубликованы в Германии.

Широта взглядов, большой интерес к физической химии, привлекают его внимание к проблемам токсикологии и фармакологии.

В 1927 году Н.В.Лазарев получает предложение переехать в Ленинград в лабораторию физиологических проблем завода «Красный треугольник» для изучения бензиновых отравлений – основного вредного фактора в резиновом производстве. Уже в 1928 году он публикует статью, в которой подчеркивает, что ядовиты не только различные примеси к бензину, ядовит сам бензин. А в 1931 году выходит монография Н.В.Лазарева «Бензин как промышленный яд». В ней впервые указывается, что в силу химической инертности углеводородов их токсичность определяется не столько химическими, сколько физико-химическими свойствами. При остром отравлении бензином мы имеем дело с наркотическими концентрациями его паров. Разница в силе действия различных наркотиков зависит от различий их физико-химических свойств. Эта идея была развита в книгах Н.В. Лазарева «Наркотики» (1940) и «Неэлектролиты»(1944), где была сформулирована проблема общетоксикологического наркотического (неспецифического, физического, неэлетролитного, общеугнетающего) эффекта чужеродных веществ. Несмотря на многообразие типов действия химических соединений на организм, в характере этого действия есть нечто общее. Наиболее оно выражено у неэлектролитов – веществ, широко используемых в промышленности. Неэлектролиты обладают способностью оказывать неспецифическое наркотическое действие, которое маскируется более мощным или ранее наступающим отравлением. Н.В.Лазарев предложил специальный термин – «неэлектролитное действие», которое включает в себя понятие о наркотическом эффекте. Было показано, что качественные различия в действии веществ могут быть результатом их способности вступать в организме в химические реакции, не имеющие отношения к их физическому действию. Они могут быть результатом неодинаковой скорости, с которой разные вещества всасываются в организме и выделяются из него. Кроме того, качественные и количественные различия в действии разных наркотических веществ связаны с их физико-химическим свойствами.

Идея зависимости выраженности и особенностей биологического действия веществ от их физико-химических свойств стала существенным вкладом Н.В.Лазарева в общую токсикологию.

С 1933 года начинает выходить фундаментальный справочник «Вредные вещества в промышленности», расширенное издание которого было завершено в 1976 г. учениками Н.В.Лазарева.

В военные годы проф. Н.В.Лазарев заведует кафедрой фармакологии в Военно-морской медицинской академии. Под его руководством проводятся многочисленные исследования, в том числе изучаются и актуальные в боевых условиях стимуляторы нервной системы. Изученный военными фармакологами под руководством проф. Н.В. Лазарева фенамин устранял у бойцов усталость и потребность во сне, вызывал прилив сил. Кроме того, Николаем Васильевичем проводились работы по изучению биологического действия инертных газов под давлением, что имело важное значение при кессонных работах.

7 августа 1945 года на следующий день после взрыва атомной бомбы над Хиросимой Н.В. Лазарев собирает сотрудников и объявляет, что все текущие научные исследования прекращаются и все будут заниматься самым актуальным на сегодняшний день – стимуляторами репаративной регенерации. И в качестве средств стимуляции репаративной регенерации он предлагает начать изучение производных пиримидиновых и пуриновых оснований нуклеиновых кислот. Эта идея полностью оправдала себя. Были созданы активные стимуляторы репаративной регенерации из класса пиримидинов и пуринов. Вошли в практику препараты пентоксил и метилурацил. Галина Ивановна Фелистович провела предклинические испытания и клинические исследования пентоксила при токсических алейкиях. Работами Михаила Лазаревича Гершановича была установлена эффективность метилурацила в лечении лучевых повреждений толстого кишечника, мочевого пузыря, кожи.

Одним из аналогов пуринов, созданных под руководством Н.В.Лазарева, был 2-бензилбензимидазол хлоргидрат, которому Николай Васильевич дал название дибазол. Было установлено, что помимо гипотензивных свойств дибазол оказывает лечебное действие при некоторых заболеваниях спинного мозга, в частности, при лечении последствий полимиелита, при поражении периферических нервов, при синдроме вялого паралича. Кроме лечебного действия у дибазола обнаружился еще и профилактический эффект, выражавшийся в повышении устойчивости организма к различного рода повреждающим воздействиям химической, физической и биологической природы. Эти наблюдения дали основание Н.В. Лазареву сформулировать гениальную гипотезу о существовании в организме особого состояния (СНПС – состояние неспецифически повышенной сопротивляемости), которое характеризуется оптимизацией защитного потенциала организма. Помимо дибазола СНПС вызывают целый ряд веществ природного происхождения , а именно, женьшень, элеутерококк колючий родиола розовая, пантокрин и другие лекарства, названные Н.В. Лазаревым адаптогенами. В исследованиях, проведенных под руководством Н.В. Лазарева было установлено, что адаптогены повышают устойчивость организма к канцерогенным воздействиям, а также к токсическому действию химиотерапии. Эти свойства адаптогенов дали начало новому профилактическому направлению в медицине, и в частности, в онкологии. Усилиями Н.В. Лазарева дибазол, женьшень и элеутерококк колючий были включены в отечественную фармакопею.

Логическим продолжением идеи использования нормальных метаболитов пиримидинов и пуринов для стимуляции восстановительной клеточной пролиферации было использование антиметаболитов пиримидинов и пуринов для угнетения клеточной пролиферации при опухолевом процессе. Эту идею, как и вообще идею применения антиметаболитов в терапевтической онкологии, одним из первых высказал Н.В. Лазарев.

В 1947 году выходит монография Н.В. Лазарева «Эволюция фармакологии», в которой указывалась необходимость применения в фармакологии методов экспериментальной терапии.

В 1950-е годы выходят «Фармакология патологических процессов», «Воспроизведение заболеваний у животных для экспериментально-терапевтических исследований», «Лекарственная регуляция воспалительного процесса»

В 1961 году публикуется двухтомное «Руководство по фармакологии».

В 1966 году выходит книга «Введение в геогигиену». В ней поднимается вопрос о неблагоприятных планетарных воздействиях деятельности человека, о том, что потомкам неизбежно придется расплачиваться за наши необдуманные действия, за ущерб, нанесенный планете, о беззащитности потомства перед деяниями предшественников. Ибо, как сказано в Писании: «Отцы наши грешили, их уж нет, а мы несем наказание за беззакония их» (Плач Иеремии. Гл. 5:7).

Идея значимости физико-химических свойств соединений наряду с их химическими свойствами оказалась плодотворной и в работах Н.В.Лазарева и его последователей в области онкофармакологии. Действительно, такая физико-химическая особенность как гидрофильно-гидрофобный баланс определяет проходимость вещества через биологические барьеры, а от этого могут зависеть избирательность противоопухолевого действия препарата. Впоследствии с учетом физико-химических свойств были синтезированы производное этилениминов диоксадэт и производное алкилнитрозоуреидов хлонизол.

Н.В. Лазарев был прекрасным научным руководителем. Под его руководством написано свыше ста кандидатских и докторских диссертаций. И все его ученики восторженно свидетельствуют, что руководство в процессе работы было реальным и очень плодотворным. И еще одна особенность Николая Васильевича как руководителя. Как правило, рукопись диссертации, а это буквально была рукопись, написанная от руки, Николай Васильевич никогда не требовал, чтобы ему давали машинопись, (в те годы мало кому удавалось напечатать на машинке черновой экземпляр), прочитывалась за один день или ночь. На следующий день она возвращалась автору с подробными замечаниями. Большое внимание уделял Николай Васильевич языку научных работ. Например, он обращал внимание, что многие статьи пестрят словом «является» и запрещал нам использовать это слово. Для совершенствования языка Н.В. Лазарев рекомендовал больше читать художественную литературу, особенно произведения И.С. Тургенева. А для развития научного воображения советовал читать классические детективы.

Будучи высокообразованным, Н.В. Лазарев стремился повысить и наш образовательный уровень. На вопрос нового аспиранта, с чего ему начать изучение фармакологии Николай Васильевич ответил, что сначала надо прочесть хороший учебник истории древнего мира, потом истории средних веков, а затем новой истории.

Поражала широта интересов Николая Васильевича. Однажды мы ехали с ним на такси. Возле каждого старинного Санкт-Петербургского дома он просил остановиться. Мы выходили из машины и пораженные слушали его рассказ об особенностях архитектуры дома и его истории.

Под конец таксист прошептал: «Вот это да! Вот это человек!»

В то же время Николай Васильевич возражал против напрасной траты времени и сил на приобретение сведений, которые мало когда смогут пригодиться. Например, нам, выпускникам медицинских институтов, он устроил шуточный опрос, что мы помним по анатомии височной кости. Многие припомнили некоторые детали. И только один признался, что все забыл начисто. К нашему удивлению, Николай Васильевич похвалил именно его, сказав, что для того, чтобы высоко подняться, надо освободиться от балласта.

Сам великий труженик, Николай Васильевич призывал нас к ежедневному упорному труду. Однажды утром в понедельник он сказал нам, что вчера в воскресенье около десяти часов вечера он проезжал мимо института, посмотрел на окна лабораторий. «И представляете? – воскликнул с удивлением. – Ни в одном из окон не горел свет!»

Николай Васильевич повторял: «Трудитесь, как каторжные. Используйте любые возможности. Не говорите, что у вас сегодня нет условий для плодотворного творчества. Не рассчитывайте, что кто-то вдруг создаст более благоприятные условия. Не надейтесь, что завтра будет лучше. Завтра будет еще хуже, уверяю вас».

В год 120-летия со дня рождения нашего Учителя, хотим сказать, что все, кто с ним общался, сохранили глубокую признательность выдающему учёному, человеку и гражданину Николаю Васильевичу Лазареву.

НОВЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТОКСИКОЛОГИИ И СМЕЖНЫМ ДИСЦИПЛИНАМ

УДК 614.2/.8(075.8)
ББК 51.20я73
Г 79

Авторский коллектив: Гребенюк А.Н., Башарин В.А., Сидоров Д.А., Бутомо Н.В., Горячев А.Б., Давыдова Е.В., Зацепин В.В., Игонина Н.А., Конев В.В., Кононов В.Н., Кузин А.А., Легеза В.И., Луцык М.А., Маркизова Н.Ф., Мирошниченко Ю.В., Мусийчук Ю.И., Мясников В.А., Полозова Е.В., Преображенская Т.Н., Рейнюк В.Л., Рыбалко В.М., Смирнов Н.А., Стрелова О.Ю., Тарумов Р.А., Шилов Ю.В.

Рецензенты: профессор кафедры организации и тактики медицинской службы Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова заслуженный деятель науки РФ доктор медицинских наук профессор А.М. Шелепов; профессор кафедры безопасности жизнедеятельности и медицины катастроф Первого Московского медицинского университета им. И.М. Сеченова доктор медицинских наук доцент А.А. Тимошевский

Гребенюк А.Н., Башарин В.А., Сидоров Д.А. и др. **Безопасность жизнедеятельности. Медицина катастроф:** Учебник для курсантов и студентов медицинских и фармацевтических вузов (факультетов) / Под ред. А.Н. Гребенюка. – Том II. Медицина катастроф. – СПб.: ВМедА, 2015. – 300 с.

Учебник подготовлен в соответствии с учебной программой и тематическим планом изучения учебной дисциплины «Безопасность жизнедеятельности. Медицина катастроф». В нем изложены основы лечебно-эвакуационного обеспечения населения в чрезвычайных ситуациях мирного и военного времени, современные подходы к медико-санитарному обеспечению населения при ликвидации последствий чрезвычайных ситуаций химической и радиационной природы, природного, дорожно-транспортного, взрыво- и пожароопасного характера, представлены основные санитарно-противоэпидемические (профилактические) мероприятия при ликвидации последствий чрезвычайных ситуаций, даны основы организации медицинского снабжения в чрезвычайных ситуациях, описаны задачи, организационная структура и органы управления Всероссийской службой медицины катастроф.

Учебник предназначен для курсантов и студентов факультетов подготовки врачей Военно-медицинской академии, но может быть использован для студентов медицинских и фармацевтических вузов (факультетов).

ISBN 978-5-94277-028-X

ПЕРЕЧЕНЬ ПУБЛИКАЦИЙ, ПОМЕЩЕННЫХ В ЖУРНАЛЕ «ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ ВЕСТНИК» В 2015 ГОДУ

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

ПРЕДЛАГАЕТ НОВУЮ ВЕРСИЮ

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

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

АРИПС «ОПАСНЫЕ ВЕЩЕСТВА» НОВАЯ ВЕРСИЯ включает в себя:

- физико-химические характеристики, данные о хранении, транспортировке, утилизации, пожаровзрывоопасность
- параметры токсикометрии (показатели острой токсичности при различных путях поступления, кумулятивности, оценку специфических и отдаленных эффектов)
- показатели экологической безопасности
- гигиенические и экологические нормативы: ОБУВ и ПДК загрязняющих веществ в атмосферном воздухе населенных мест, ОБУВ и ПДК вредных веществ в воздухе рабочей зоны, ОДУ и ПДК химических веществ в воде водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования и питьевой воды, ПДК и ОДК в почве, ДУ в продуктах питания, ПДК и ОБУВ вредных веществ для воды водных объектов, имеющих рыбохозяйственное значение
- классы (категории) опасности по влиянию на здоровье человека, окружающую природную среду, а также обусловленные физико-химическими свойствами в соответствии с СГС
- коды и фразы риска, маркировку, номера ООН, КЭМ и номера аварийных карточек при железнодорожных, морских и других видах перевозки
- нормативные и библиографические данные.

Предлагаемый программный продукт предоставляет пользователю следующие возможности:
просмотр полной информации о веществе (более 300 характеристик)

- ускоренный поиск вещества по фрагменту названия IUPAC, торговому названию, синониму, номерам CAS, RTECS и EINECS, брутто формуле, дате и сроку регистрации
- вывод в файл, на печать, просмотр информации по конкретному веществу, списку веществ, сформированных в результате поиска по заданным параметрам
- актуализации и пополнения базы данных новыми веществами **АРИПС «ОПАСНЫЕ ВЕЩЕСТВА» НОВАЯ ВЕРСИЯ**

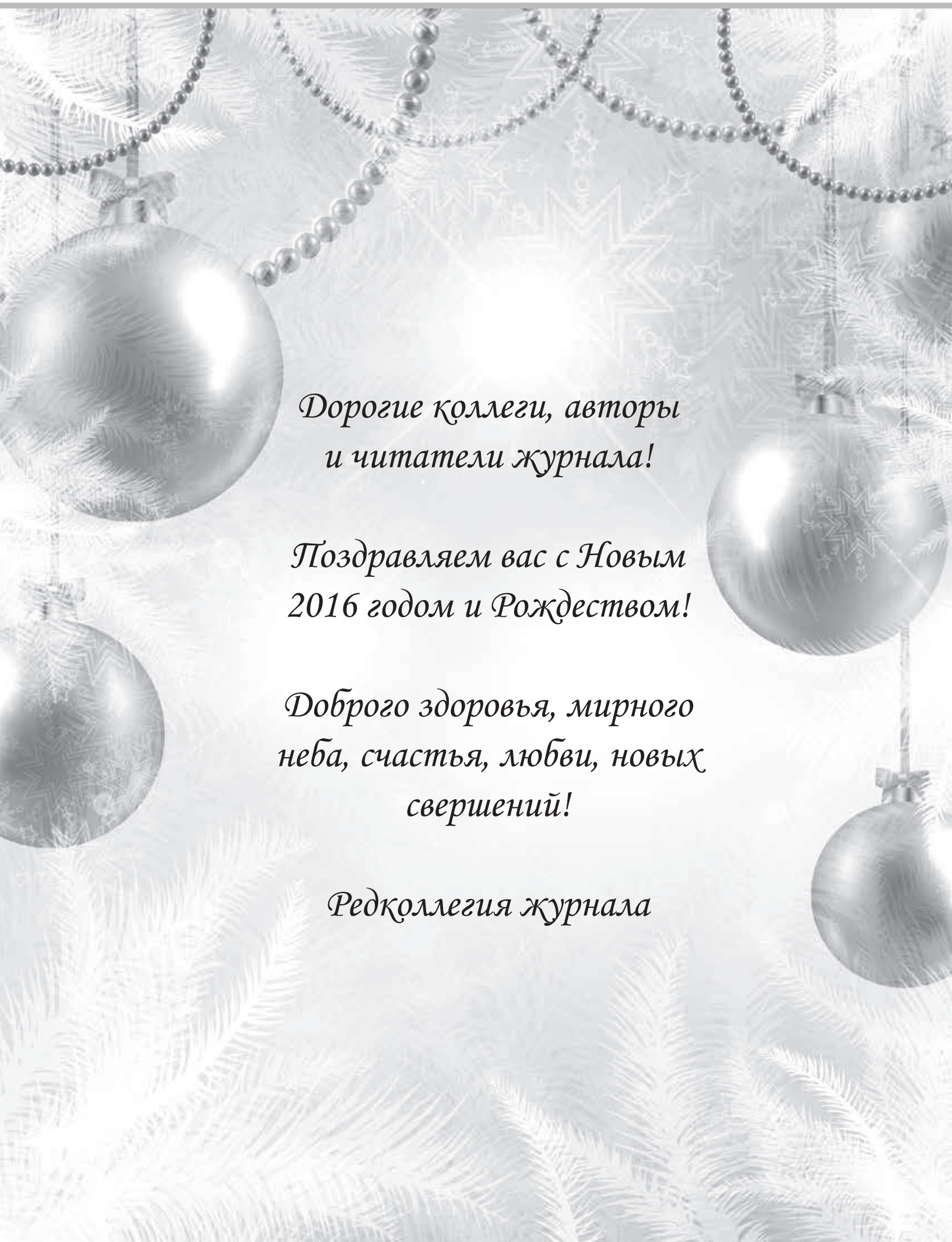
Минимальные требования к компьютеру: процессор Celeron 1,8, оперативная память – 1GB, свободное место на жестком диске 100 MB;

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

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

Если Вас заинтересовала эта информация, Вы можете связаться с нами и оставить свою заявку:

Адрес: 117105, Москва, Варшавское шоссе, 19А
Многоканальный телефон: (499) 940-97-87
Факс: (499) 940-97-75
E-mail: secretary@rpohv.ru
Веб-сайт: www.rpohv.ru, www.rpohbv.ru



Дорогие коллеги, авторы и читатели журнала!

Поздравляем вас с Новым 2016 годом и Рождеством!

Доброго здоровья, мирного неба, счастья, любви, новых свершений!

Редколлегия журнала