

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОЕ АГЕНТСТВО
САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ
ВСЕРОССИЙСКОЙ ОБЩЕСТВЕННОЙ ОРГАНИЗАЦИИ
ТОКСИКОЛОГОВ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УНИТАРНОЕ
ПРЕДПРИЯТИЕ «НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ГИГИЕНЫ, ПРОФПАТОЛОГИИ И ЭКОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА»
ФЕДЕРАЛЬНОГО МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО АГЕНТСТВА
(ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА РОССИИ)
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ «ИНСТИТУТ ТОКСИКОЛОГИИ
ФЕДЕРАЛЬНОГО МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО АГЕНТСТВА»
(ФГБУН ИТ ФМБА РОССИИ)**

АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ ТОКСИКОЛОГИИ, ГИГИЕНЫ, ЭКОЛОГИИ

Сборник материалов совместного заседания

**Санкт-Петербургского отделения Всероссийской общественной
организации токсикологов и объединенного Ученого совета
ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России и ФГБУН ИТ ФМБА России,
посвященного 100-летию со дня рождения профессора
С.Д. Заугольникова**

**Под общей редакцией
доктора медицинских наук, профессора В.Р. Рембовского**

Санкт-Петербург

2017

УДК 613.6; 615.9; 616.6

ББК 51.20

А 43

Редакционный совет:

акад. РАН, проф., д.м.н. Софронов Г.А., проф., д.м.н. Луковникова Л.В., проф., д.м.н. Радилов А.С., проф., д.м.н. Рембовский В.Р., д.м.н. Иванов М.Б., д.м.н. Могиленкова Л.А., к.м.н. Киселев Д.Б.

В сборник включены тезисы докладов, подготовленные учеными научных организаций ФМБА России, ФГУП ГосНИИОХТ, ФГУП РНЦ «Прикладная химия» и других научных учреждений.

В материалах представленных тезисов отражены результаты научных исследований в области токсикологии, гигиены, синтеза фармпрепаратов, профпатологии, медицинской оценки спортивной деятельности, аналитической химии.

Сборник предназначен для широкого круга специалистов, занятых в сфере профилактической медицины.

Актуальные проблемы токсикологии, гигиены, экологии / Под общ. ред. В.Р. Рембовского // Сборник материалов совместного заседания Санкт-Петербургского отделения общественной организации токсикологов и объединенного Ученого совета ФГУП «НИИ ГПЭЧ», ФГБУН ИТ ФМБА России, посвященного 100-летию со дня рождения профессора С.Д. Заугольниковой – СПб.: Изд-во Политехн. ун-та., 2017. – 210 с.

СОДЕРЖАНИЕ

Рембовский В.Р., Радилев А.С., Могилевкова Л.А.

Научные поиски – путь к звездам. 100-летний юбилей С.Д. Заугольникова 7

НАУЧНОЕ ТВОРЧЕСТВО С.Д. ЗАУГОЛЬНИКОВА

Кондрашов В.А.

Воспоминания о С.Д. Заугольникове 15

Мусийчук Ю.И.

Творческое наследие С.Д. Заугольникова 20

АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ТОКСИКОЛОГИИ И ФАРМАКОТЕРАПИИ

*Бабаков В.Н., Роговская Н.Ю., Курдюков И.Д., Бельтюков П.П.,
Дулов С.А., Радилев А.С.*

Цитопротекторный эффект эндогенного агониста арилгидрокарбонового рецептора при токсическом действии бенз(а)пирена в клетках гепатомы человека линии НераRG 28

Криворотев Д.В., Соболев В.Е., Кузнецов В.А., Радилев А.С., Дулов С.А.

Разработка перспективных противорвотных средств на основе диметпрамида 33

Кузнецов В.А., Радилев А.С., Дулов С.А., Поддубная М.И., Криворотев Д.В.

Роль биологически активных добавок к пище в профилактике профессиональных заболеваний 36

Лаптев Д.С., Петунов С.Г., Бобков Д.В., Радилев А.С.

Влияние диметпрамида сукцината на изолированное сердце крысы. Роль периферических дофаминовых и серотониновых рецепторов 38

Протасова Г.А., Шабашева Л.В., Попов В.Б.

Коррекция экспериментального острого токсического гепатита фетальными стволовыми клетками 44

Пушкин А.С., Образцов Н.В., Другова Е.Д., Камшилин С.А.,

Дворецкая С.И., Полехина О.В., Борунов А.В.

Изменение долевого распределения клеток периферической крови лабораторных животных после внутрижелудочного введения этанола 52

*Радилев А.С., Дулов С.А., Ерунова Н.В., Карташов Ю.И., Новиков И.И.,
Франчук В.Б., Первушина К.В., Маслюк А.М.*

Токсикологическая оценка монотоплива «ЗТ» на основе нитрата гидроксиламмония 59

- Радилов А.С., Дулов С.А., Криворотов Д.В., Абзианидзе В.В., Кузнецов В.А.*
Разработка химической технологии получения современных антагонистов опиоидных рецепторов 65
- Радилов А.С., Шкаева И.Е., Комбарова М.Ю.*
Проблемы обеспечения санитарно-эпидемиологической безопасности в ракетно-космической отрасли и пути их решения 67
- Рембовский В.Р., Могиленкова Л.А.*
Перспективы персонализированной токсикологии 69
- Сайтгалина М.А., Попов В.Б.*
Синтез монооксигеназы CYP1A1 в семенниках и яичниках инбредных линий мышей при токсическом воздействии 77
- Сидорин Г.И., Луковникова Л.В.*
Механизмы адаптации организма к действию химических веществ 82
- Томилин Н.В., Филько О.А., Храброва А.В., Соловьева Н.Е., Утсаль В.А., Краснов К.А.*
Сравнительное экспериментальное исследование генотоксического и цитотоксического действия нитрозодиметиламина в условиях хронического введения в субтоксических дозах с помощью микроядерного теста на ретикулоцитах и на культуре лимфоцитов периферической крови белых крыс 89
- Туржова Е.Б.*
Система биотестирования опасных химических веществ в опытах *in vitro* 91
- Уколов А.И., Сорокоумов П.Н., Радилов А.С.*
Экстраполяция токсикокинетических параметров летучих промышленных загрязнителей и фосфорорганических пестицидов 98
- Чермашенцева Э.В., Дьячкова Л.Г., Чермашенцева Н.А.*
Сравнительная токсичность довсходовых гербицидов на основе кломазона и оксифлуорфена для цианобактерий *Anabaena* в водной среде 105
- МЕДИКО-ГИГИЕНИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ВЛИЯНИЯ ХИМИЧЕСКОГО ФАКТОРА НА ЗДОРОВЬЕ РАБОТАЮЩИХ И НАСЕЛЕНИЯ, СРЕДУ ИХ ОБИТАНИЯ**
- Габибов И.М.*
От нейрона к мозгу и другим системам организма, подверженного воздействию факторов различной природы 110

- Земляной А.В., Дулов С.А., Бельтюков П.П., Варлашова М.Б., Вивуланец Е.В., Оникиенко С.Б., Баранов Г.А., Хухарев В.В.*
Повышение адаптационных резервов организма человека в условиях воздействия неблагоприятных факторов производственной среды 114
- Киселев А.В., Мельцер А.В., Григорьева Я.В., Ерастова Н.В.*
Гигиенические аспекты использования результатов расчета загрязнения атмосферного воздуха для целей социально-гигиенического мониторинга 119
- Креницын Н.В., Киселев Д.Б., Танюхина О.Н., Цимбал М.В.*
Оценка состояния здоровья персонала объекта по хранению и уничтожению химического оружия в пос. Плановый Щучанского района Курганской области. 121
- Могилenkova Л.А., Рембовский В.Р., Истомин А.В.*
Значение генетического фактора при составлении лечебно-пищевого рациона работающих с опасными химическими веществами 125
- Пименова М.Н., Янно Л.В.*
Роль генетических полиморфизмов в формировании предрасположенности к химически обусловленной патологии у работающих в контакте с опасными химическими веществами 133
- Половцев С.В., Осипов Ю.Г., Керножицкая С.А., Пеганова Н.В., Карташов Ю.И.*
Химические реагенты для ликвидации аварийных ситуаций с пожаро-взрывоопасными и токсичными жидкими химическими продуктами 140
- Рембовский В.Р., Могилenkova Л.А., Филиппов В.Л., Филиппова Ю.В.*
Перспективы индивидуальной диагностики психосоматического здоровья работающих на предприятиях с опасными условиями труда 142
- Танюхина О.Н., Комбарова М.Ю., Тидген В.П., Цибульская Е.А.*
Гигиеническая оценка качества воды поверхностных водоемов, расположенных на территории ЗЗМ объекта ХУХО г. Почеп 149
- Танюхина О.Н., Комбарова М.Ю., Тидген В.П., Цибульская Е.А.*
Гигиеническая оценка качества питьевой воды в районе расположения ЗЗМ объекта ХУХО г. Почеп 156
- Филиппов В.Л., Рембовский В.Р., Филиппова Ю.В., Креницын Н.В.*
Концептуальные подходы к организации и ведению мониторинга состояния здоровья работающих на опасных химических объектах 160

МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ СПОРТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ

Егоров Н.А.

Современные тенденции в оценке анаэробной и аэробной составляющих физической работоспособности у спортсменов в динамике тренировочного процесса 167

Киселев А.Д., Новосельский Д.В.

Коррекция функционального состояния центральной нервной системы с помощью тренинга с биологической обратной связью 174

Николаева В.Н.

Применение стабилметрического метода для оценки показателей функции равновесия и координации движений в клинической практике и спорте 181

Новосельский Д.В., Киселев А.Д., Протасов С.В., Криницын Н.В.

Оценка показателей сердечно-сосудистой и дыхательной систем у спортсменов скоростно-силовых и циклических видов спорта, находящихся на тренировочных мероприятиях по совершенствованию спортивного мастерства 188

Рембовский В.Р., Ерофеев Г.Г., Радилов А.С., Криницын Н.В., Протасов С.В.

Применение интегральных показателей физической работоспособности для оценки эффективности тренировочных мероприятий 195

**ОСНОВНЫЕ ОПУБЛИКОВАННЫЕ НАУЧНЫЕ ТРУДЫ
ПРОФЕССОРА С.Д. ЗАУГОЛЬНИКОВА 202**

НАУЧНЫЕ ПОИСКИ – ПУТЬ К ЗВЕЗДАМ

100-ЛЕТНИЙ ЮБИЛЕЙ

С.Д. ЗАУГОЛЬНИКОВА

В.Р. Рембовский, А.С. Радиков, Л.А. Могиленкова
ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия
gpech@fmbamail.ru

Столетие со дня рождения выдающегося советского токсиколога, профессора С.Д. Заугольников совпадает со 100-летним юбилеем Великой Октябрьской социалистической революции – Сергей Дмитриевич родился в г. Оренбурге в день (25 октября по старому стилю) и год основания первого Советского государства, повлиявшего на последующий ход событий мировой истории и, конечно, на его личную жизнь. Развитие советской науки позволило раскрыть потенциал С.Д. Заугольникова – ученого-организатора, вышедшего из семьи «простых» служащих.



Жизненный путь Сергея Дмитриевича связан с медицинским обеспечением безопасности нашей Родины, сохранением здоровья ее граждан. В 1937 г. после окончания фельдшерско-акушерской школы Сергей Дмитриевич добровольцем ушел в Советскую Армию на службу в Военно-морском флоте. В 1939 г. поступил в Военно-морскую медицинскую академию в Ленинграде. В период Великой отечественной войны во время блокады Ленинграда академия была эвакуирована в г. Киров, откуда, после ускоренного курса обучения в звании военноморского врача С.Д. Заугольников в 1944 г. поступил на службу в Северном флоте на линкоре «Архангельск», а затем был назначен начальником медицинской службы береговой охраны.

После Великой Отечественной войны из плеяды отечественных токсикологов значимый вклад в развитие военной токсикологии внес и С.Д. Заугольников. В этом разделе науки, где решались фундаментальные и прикладные задачи совершенствования средств и методов защиты человека от боевых отравляющих веществ, а также учебной дисциплины, обеспечивающей подготовку военных медицинских кадров по защите от химического оружия, велика его роль как талантливого ученого и военного педагога. Его научный путь начался в 1945 г. на кафедре фармакологии и токсикологии Военно-морской медицинской академии в качестве адъюнкта под руководством видного ученого отечественной медицины и промышленной токсикологии профессора Н.В. Лазарева. В 1948 г. С.Д. Заугольников защитил кандидатскую, а в 1957 г. докторскую диссертации. В 1960 г.

ему было присвоено звание профессора по специальности «фармакология». В академии Сергей Дмитриевич совершил научный рост от ассистента до заместителя начальника кафедры. Затем С.Д. Заугольников служил в должности начальника отдела токсикологии научно-исследовательской лаборатории № 1 Военно-медицинской ордена Ленина академии им. С.М. Кирова. После демобилизации из рядов Советской армии (1965 г.) в должности полковника медицинской службы С.Д. Заугольников в январе 1966 г. поступил в Филиал №3 (ФИБ-3) Института биофизики МЗ СССР (ИБФ), был назначен его заведующим, а в 1969 г. – заместителем директора ИБФ по научной работе (по проблеме медико-санитарного обеспечения работ с компонентами ракетных топлив – КРТ, которой он занимался с 1956 г.).

Результаты деятельности талантливого ученого Сергея Дмитриевича (и коллектива ФИБ-3 под его руководством) сохранились в памяти его учеников, коллег, достаточно широко освещены в трудах ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России, отдельные материалы которых отражены и в настоящем юбилейном сборнике [1-8].

Организаторский талант Сергея Дмитриевича Заугольникова наиболее ярко проявился в период его руководства ФИБ-3 (1966-1980 гг.). Он быстро реагировал на острые медико-санитарные проблемные вопросы, стоящие в медико-санитарном сопровождении новой отрасли народного хозяйства СССР – ракетно-космической деятельности (РКД), умело отстаивал и направлял материально-технические средства для разработки перспективных научно-исследовательских работ ФИБ-3 и внедрения их в практику, не потерявших свою актуальность и в настоящее время. Сергей Дмитриевич умел подбирать и ценить кадры, четко определять стоящие перед исполнителями задачи. Беседовал с каждым новым научным сотрудником при приеме его на работу в филиал. Созданный им коллектив специалистов был объединен на исследование глобальных проблем обеспечения химической безопасности при РКД и работах на химических, машиностроительных и других предприятиях. С.Д. Заугольниковым был введен системный подход при проведении междисциплинарных медико-биологических и других исследований, включающий поэтапное изучение токсичности веществ, внедряемых в практическую деятельность. Организована преемственность исследований, проводимых в лабораториях ФИБ-3 и других организаций ИБФ, для оперативного получения новых данных о синтезируемых веществах, создан информационный бюллетень для обеспечения специалистов информацией о новейших результатах и другими современными научными публикациями по тематикам исследования.

Большое значение при создании организационной структуры научной деятельности ФИБ-3 С.Д. Заугольников придавал научно-практическим исследованиям в области промышленной токсикологии и

оценки опасности химических факторов для здоровья человека, по оказанию медицинской помощи и сохранению здоровья работающих, подвергшихся острым отравлениям при освоении новых опасных технологий.

Медико-санитарное сопровождение РКД предусматривало все этапы исследования новых веществ: от токсикологической экспресс оценки до гигиенического их нормирования во всех объектах производственной и окружающей среды; проведение изучения влияния условий труда на химических производствах и состояния окружающей среды вокруг них на здоровье персонала и населения, подвергающегося возможности воздействия опасных химических веществ; а затем и корректировку разработанных гигиенических нормативов по данным натурных исследований. С.Д. Заугольников большое внимание уделял выбору методов диагностики и разработке средств терапии интоксикаций опасными химическими веществами, а при утверждении гигиенического норматива – обязательному сопровождению нормативного документа мерами защиты и лекарственными средствами по оказанию лечебной помощи при острых отравлениях. Для эффективного выявления ранних признаков хронических профинтоксикаций на обследуемых объектах были организованы углубленные комплексные клинико-гигиенические и эпидемиологические исследования состояния здоровья больших когорт наблюдения, направление лиц с подозрением на развитие профзаболевания в клинику профпатологии для диагностики, лечения профзаболеваний и медико-социальной экспертизы пострадавших. Итогом проведенных научно-практических работ явилось снижение распространения острых интоксикаций и других химически обусловленных заболеваний.

При участии С.Д. Заугольникова – заместителя директора Института биофизики МЗ СССР, в качестве базы для углубленных теоретических исследований действия токсических веществ на показатели биохимического гомеостаза, оценке эффективности средств индивидуальной защиты при работах с КРТ был создан филиал №5 ИБФ. Сергей Дмитриевич руководил координацией работ подразделений ФИБ-3 при разработке медико-технического задания по проектированию «НИИ токсикологии, гигиены и профпатологии» в г. Волгограде, требования которого были использованы при строительстве института.

Основными направлениями научных исследований ФИБ-3, проведенных под руководством С.Д. Заугольниковым, явились:

- оценка физико-химических и токсических свойств, параметров токсичности, опасности новых химических соединений;
- создание системы предварительной токсикологической оценки веществ, предлагаемых для внедрения в качестве КРТ;
- гигиеническое регламентирование КРТ, продуктов их получения,

других химических соединений в объектах производственной и окружающей среды, в том числе при аварийных ситуациях;

- разработка научных принципов для переноса данных, полученных в опытах на животных на человека;

- оценка условий труда и окружающей среды при РКД;

- разработка мер безопасности при получении и использовании токсичных химикатов;

- оценка состояния здоровья персонала объектов РКД и населения, проживающего на территориях вблизи этих объектов;

- выявление новых форм профзаболеваний на основе изучения особенностей клинической картины, течения патологического процесса при действии ранее неизученными КРТ и другими токсикантами;

- разработка методов экспресс- и скрининг-диагностики предлагаемых для внедрения в практику химикатов;

- разработка средств диагностики и лечение, разработка лечебно-профилактических мероприятий;

- организационно-методическое и научно-информационное обеспечение научно-исследовательских работ.

Обладая неутомимой энергией, целеустремленностью, настойчивостью, творческой инициативой, трудолюбием, выдающимися организаторскими способностями, Сергей Дмитриевич развил новые научные направления, результаты которых успешно были внедрены в народное хозяйство. Специалисты разных подразделений ФИБ-3, начиная с первого этапа внедрения новых веществ в практику – поиска и лабораторного синтеза, зачастую одновременно выполняли совместные работы по токсикологической оценке химического фактора, гигиеническому регламентированию новых химических веществ, выявлению влияния ранее не исследованных производственных факторов на организм работающих. Изучали клинические проявления острой и хронической интоксикации, вызванные новыми химическими соединениями, вели поиск и разработку методов диагностики и способов лечения острых и хронических интоксикаций рядом токсикантов, в том числе вновь синтезированных и ранее неизученных токсичных КРТ. Делились первыми результатами по изучению токсичности, обоснованию ориентировочных нормативов и гигиенических регламентов, оценке физико-химических свойств и разработке методов индикации новых соединений, планированию санитарно-химического контроля и оценке механизмов патофизиологического действия соединений и т.д.

В совместной работе с химиками-синтетиками при организации токсической оценки новых КРТ было преодолено несоответствие между ограниченными методическими возможностями, материальной базой научно-исследовательских организаций ИБФ и необходимостью экспрессного изучения токсических свойств большого количества

химических веществ, предъявляемых к опытному применению и в дальнейшем для широкого внедрения эффективных и малотоксичных соединений в ракетно-космическую отрасль. Созданная с этой целью система предварительной токсикологической оценки новых химических соединений приобрела теоретическое признание и нашла важное практическое применение: секция промышленной токсикологии Проблемной комиссии «Гигиена труда» в 1973 году приняла решение об утверждении расчетных ПДК под названием ОБУВ (ориентировочно безопасный уровень воздействия) в качестве временных нормативов, которые были включены в ГОСТ 12.1.007-76 Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности.

Для оценки степени токсичности и опасности вредных химических веществ совместно с С.Д. Заугольниковым были разработаны и внедрены: токсиколого-гигиеническая классификация степени опасности вредных химических веществ при ингаляционном и энтеральном путях поступления – использована при создании классификации опасности химических веществ (ГОСТ 12.1.007-76); математическое прогнозирование токсичности, опасности и величин ПДК вредных химических веществ и другие научные разработки, которые получили всеобщее признание в области промышленной токсикологии и гигиены.

В рамках обеспечения нормативно-методической документации по сопровождению РКД и других видов народно-хозяйственной деятельности были разработаны санитарные правила при работах с рядом веществ, методические рекомендации по оценке средств индивидуальной защиты, проведена разработка и уточнение гигиенических нормативов новых химических соединений; разрабатывались санитарно-гигиенические и лечебно-профилактические рекомендации по улучшению условий труда и окружающей среды, сохранению здоровья работающих на опасных производствах и населения, проживающего вблизи этих объектов, обосновывался прогноз гигиенической ситуации и изменения состояния здоровья лиц, контактирующих с КРТ и другими химикатами, обосновывались гигиенические и клинические критерии оценки влияния на здоровье химического и других факторов.

Сергей Дмитриевич являлся автором более 140 научных работ в области фармакологии, токсикологии, гигиены и профпатологии, в том числе 6 монографий, включая совместную с С.Н. Голиковым монографию «Реактиваторы холинэстеразы» (1970). Возглавлял редакцию ведомственного журнала, редактировал ряд монографий и сборников научных работ, принимал участие в организации научно-практических конференций.

Под руководством С.Д. Заугольникова было защищено 30 кандидатских и 5 докторских диссертаций. Многие его ученики возглавили научные учреждения и кафедры. Разносторонние научные

интересы Сергея Дмитриевича, воплотившиеся в создание многопрофильного учреждения, структура которого сохраняется в приемнике ФИБ-3 – ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России, находят свое развитие в работах его учеников и продолжателей и в настоящее время.

Большое значение для подготовки врачей МСО (МСЧ) имели его лекции, проводившиеся в этих учреждениях, а также консультативная работа по оказанию помощи практическому здравоохранению в вопросах диагностики интоксикаций, организации защиты рабочих и населения от действия токсических веществ. Его выступления на научно-практические темы живо воспринимались сотрудниками ФИБ-3, МСЧ и рабочими предприятий. В течение многих лет С.Д. Заугольников являлся членом Правления секции токсикологии при Ленинградском научном обществе физиологов, биохимиков и фармакологов, а с 1962 г. членом Правления и казначеем Ленинградского общества фармакологов, был одним из инициаторов и организаторов секции токсикологии этого общества.

Постоянное овладение новыми знаниями, общение с большим количеством исследователей, обсуждение научных проблем на конференциях, семинарах, с практическими работниками предприятий и медсанчастей, редактирование сборников научных трудов, включая информационного бюллетеня, главным редактором которого был С.Д. Заугольников, строительство зданий института, участие в организации родственных научных учреждений в стране сочетались с дружелюбием, артистичностью выступлений, чувством юмора. С.Д. Заугольников пользовался заслуженным авторитетом, уважением и любовью сотрудников ФИБ-3, ИБФ и медицинской общественности г. Ленинграда.

За многолетнюю плодотворную научную работу и службу в армии С.Д. Заугольников был награжден орденами Трудового Красного знамени, Красной звезды, медалями и благодарностями Минздрава и Министерства обороны СССР.

В личной и семейной жизни с Евдокией Андреевной также все отлично сложилось у СД, как мы называли его «за глаза»: «построил дом, посадил дерево, воспитал сына». Сын Сергея Дмитриевича – профессор Заугольников Вячеслав Сергеевич – окончил лечебный факультет 1-го Ленинградского медицинского института им. акад. И.П. Павлова; защитил кандидатскую и докторские диссертации соответственно по специальностям «хирургия» и «анестезиология и реаниматология». Прошел научный путь от ассистента кафедры общей хирургии 1-го Ленинградского медицинского института до заведующего кафедрой фармакологии Кировской государственной медицинской академии; активно занимался научно-практической работой в области клинической фармакологии в анестезиологии и реаниматологии, системы гомеостаза больных в критических состояниях, влияния

хирургического стресса на оперируемых больных.

Память о легендарном человеке и ученом С.Д. Заугольникове, внесшем неоценимый вклад в основание научной школы ФИБ-3 (НИИ ГПЭЧ) и других родственных научных медицинских организаций, передается из поколения в поколение деятелей профилактической и клинической медицины системы ФМБА России. Коллеги, работавшие с нашим славным УЧИТЕЛЕМ, и новые его научные продолжатели-соратники всегда благодарны Сергею Дмитриевичу Заугольникову за поддержку, развитие творческой активности, его идеи и стремления к научному поиску во благо обеспечения санитарно-гигиенического благополучия, сохранения здоровья людей и среды их обитания.

Литература

1. История создания и развития ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА РОССИИ // 50-летие Федерального государственного унитарного предприятия «Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека» Федерального медико-биологического агентства. Исторические очерки / Под ред. В.Р. Рембовского и А.С. Радилова. – СПб., 2012. – С. 9–30.
2. Кондрашов В.А., Могиленкова Л.А., Нагорный С.В. Организация С.Д. Заугольниковым научных исследований по обеспечению безопасности при производстве и использовании вредных и опасных химических токсикантов // Вопросы обеспечения химической безопасности в Российской Федерации // Сб. трудов совместн. заседания секции №4 «Токсикология, гигиена, профпатология, индикация, дегазация при работе с высокотоксичными веществами» ПК ФМБА России, СПб. отделения Всеросс. общества токсикологов и Ученого Совета ФГУП «НИИГПЭЧ» ФМБА России, посв. 90-летию со дня рождения С.Д. Заугольникова / Под ред. А.Н. Гребенюка, С.П. Нечипоренко, В.Р. Рембовского, А.С. Радилова. – СПб.: Изд-во «Фолиант», 2007. – С. 12–18.
3. Лойт А.О., Хаславская С.Л., Трейстер Т.Е. Вклад С.Д. Заугольникова в развитие отечественной токсикологической науки // Там же. – С. 18–21.
4. Мусийчук Ю.И. Сергей Дмитриевич Заугольников – к 90-летию со дня рождения // Там же. – С. 22–29.
5. Рембовский В.Р., Радилов А.С., Могиленкова Л.А. Роль С.Д. Заугольникова в информационном обеспечении работ с опасными химическими веществами// Там же. – С. 29–31.
6. Мусийчук Ю.И. Жизненный и творческий путь С.Д. Заугольникова // Медицина труда и промышленная экология. 1993. – №7-8. – С. 1–4.
7. Основные направления и перспективы развития научно-практической деятельности федерального государственного унитарного предприятия «Научно-исследовательский институт гигиены,

профпатологии и экологии человека» Федерального медико-биологического агентства в системе обеспечения химической безопасности // Научно-практическая деятельность ФГУП «НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России»: Решение проблемы обеспечения химической безопасности в российской федерации / Под ред. В.Р. Рембовского // Труды ФГУП «НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России, посв. 50-летию со дня основания – СПб.: ЭЛБИ–СПб., 2012. – С.13–25.

8. Рембовский В.Р. Основные направления и перспективы научных исследований ФГУП «Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека» Федерального медико-биологического агентства Актуальные проблемы химической безопасности в Российской Федерации / Под общей ред. В.Р. Рембовского и А.С. Радилова // Сб. трудов Всеросс. научно-практ. конф., посв. 45-летию ФГУП «НИИГПЭЧ» ФМБА России – СПб., 2007. – С. 15–23.

НАУЧНОЕ ТВОРЧЕСТВО С.Д. ЗАУГОЛЬНИКОВА

ВОСПОМИНАНИЯ О ПРОФЕССОРЕ СЕРГЕЕ ДМИТРИЕВИЧЕ ЗАУГОЛЬНИКОВЕ

В.А. Кондрашов

*ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия
gpech@fmbamail.ru*

Необходимо отметить, что период работы Сергея Дмитриевича Заугольников (1966-1981 гг.) в Филиале № 3 Института биофизики Министерства здравоохранения СССР (ФИБ-3) достаточно хорошо и полно был освещен в различных статьях сотрудников нашего института [5–10]. В этих публикациях отмечены заложенные С.Д. Заугольниковым основы научной деятельности в ФИБ-3, которые явились прочным фундаментом для решения новых проблем, направленных на сохранение здоровья работающих на химических предприятиях и гражданского населения в зоне воздействия этих предприятий. В связи с этим целесообразно в настоящей статье о С.Д. Заугольникове изложить, главным образом, материалы, которые не были представлены ранее в вышеуказанных статьях.

Моё знакомство и общение с Сергеем Дмитриевичем Заугольниковым началось в 1954 году на кафедре фармакологии и токсикологии, когда я учился в Военно-морской медицинской академии (ВММА). В то время С.Д. Заугольников был полковником медицинской службы (рис. 1), заместителем начальника кафедры, возглавляемой выдающимся отечественным учёным Николаем Васильевичем Лазаревым.



Рисунок 1
С.Д. Заугольников

В 1956 году в связи с первым 600-тысячным сокращением Вооруженных Сил СССР Военно-морская медицинская академия была преобразована в морской факультет Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова, а кафедра фармакологии и токсикологии была закрыта. Н.В. Лазарев возглавил кафедру фармакологии, фармации и фармакогнозии Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова, а С.Д. Заугольников с 1956 года по 1965 год стал вначале начальником отдела токсикологии Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова, а затем начальником Военной научно-исследовательской лаборатории Министерства обороны СССР.

Чтобы полнее и глубже охарактеризовать С.Д. Заугольникова как учёного и человека, необходимо сказать, что Сергей Дмитриевич прошёл прекрасное воспитание и развитие в научной школе Николая Васильевича

Лазарева. Н.В. Лазарев в течение 45 лет своей научной деятельности в области фармакологии, токсикологии, экологии и онкологии создал чрезвычайно большую научную школу, воспитал около 30 докторов наук и более 100 кандидатов наук, в том числе С. Д. Заугольников. Николай Васильевич Лазарев был широко образованным учёным, владел несколькими иностранными языками, обладал энциклопедическими знаниями в самых разных областях науки [1, 2].

С.Д. Заугольников многое воспринял от своего Учителя: был очень работоспособным и преданным научной работе. В общении – весёлый, жизнерадостный человек, обладавший отличным чувством юмора. Это хорошо видно на фото, снятом в дни празднования 50-летнего юбилея Сергея Дмитриевича Заугольникова в 1967 году (рис 2. Слева – В.А. Кондрашов, справа – С.Д. Заугольников).



Рисунок 2
В.А. Кондрашов и
С.Д. Заугольников

В конце 1965 года С.Д. Заугольников демобилизовался из Вооруженных Сил СССР и с января 1966 года стал работать заведующим Филиалом № 3 Института биофизики Минздрава СССР (ФИБ-3). Позднее С.Д. Заугольников стал одновременно и заместителем директора Института биофизики Минздрава СССР. ФИБ-3 был создан в январе 1962 года согласно Постановлению Совета министров СССР № 939-398 от 14.10.1961 г. и практически представлял собою небольшую токсикологическую лабораторию. Располагался ФИБ-3 на территории Второго опытного завода Государственного института прикладной химии (ГИПХ) недалеко от железнодорожной станции Капитолово и размещался в двух небольших зданиях. В одном здании находились сотрудники, а в другом (виварии) содержались лабораторные экспериментальные животные.

Необходимо собо отметить, что новый и главный этап плодотворного развития ФИБ-3 связан с приходом С.Д. Заугольникова в январе 1966 года в качестве его заведующего. С.Д. Заугольников сформировал высокопрофессиональный научный коллектив, способный решать сложные вопросы, стоящие перед профилактической медицинской наукой, успешно функционирующий и в настоящее время. В штат учреждения были включены научные сотрудники различных специальностей: токсикологи, химики, биохимики, патоморфологи, гигиенисты, клиницисты, математики и другие специалисты.

Медико-санитарное сопровождение работ с вредными и опасными химическими токсикантами основывалось на принципах этапности, комплексности, системности, межведомственного взаимодействия при проведении работ, обеспечивающих гарантию химической безопасности.

Основными направлениями научных исследований, организованных С.Д. Заугольниковым, являлись:

- оценка токсических свойств и гигиеническое регламентирование новых химических соединений;
- оценка условий труда и окружающей среды, разработка мер безопасности при получении и использовании токсичных химикатов;
- оценка состояния здоровья лиц, контактирующих с химикатами;
- изучение клинической картины, течения острых и хронических интоксикаций ранее неизученными химикатами, диагностика и лечение профзаболеваний, разработка лечебно-профилактических мероприятий;
- организационно-методическое и научно-информационное обеспечение плановых научно-исследовательских работ.

Для выполнения поставленных задач С.Д. Заугольников добился резкого увеличения количества научных сотрудников и вспомогательного персонала в ФИБ-3: с 40 человек в 1965 году, примерно, до 300 сотрудников в 1970 году. Под руководством Сергея Дмитриевича постепенно были созданы отделы токсикологии, гигиены и клинический отдел. Однако разместить такое количество работающих сотрудников и проводить научно-исследовательскую работу в одном небольшом здании было чрезвычайно трудно. Чердак здания и все коридоры были заставлены приборами и оборудованием. Все рабочие комнаты были переполнены сотрудниками. Когда в ФИБ-3 приезжали коллеги из других учреждений, то они с удивлением спрашивали Сергея Дмитриевича: «Как вам удаётся успешно работать в таких ужасных условиях»? Такая ситуация продолжалась до 1974 года.



Рисунок 3
Выступление С.Д.
Заугольникова на
конференции ФИБ-3

В связи с этим С. Д. Заугольников добился финансирования и организовал строительство двух больших корпусов: одного – для размещения сотрудников, а второго – для вивария (клиники лабораторных животных).

До завершения строительства главного здания в 1974 году С. Д. Заугольников договорился с руководством ГИПХ и Второго опытного завода

ГИПХ о предоставлении помещений во временное пользование для работы сотрудников ФИБ-3 и актового зала для проведения учёных советов, научных конференций и различных собраний. Сотрудники отдела профпатологии работали в больнице ГИПХ в посёлке городского типа Кузьмолловский.

Первая конференция, посвящённая итогам научных исследований, выполненных под руководством С.Д. Заугольникова в ФИБ-3, состоялась в феврале 1968 г. Проходила эта конференция в актовом зале Второго опытного завода ГИПХ.

Присутствовали научные сотрудники ФИБ-3, а также Института биофизики из Москвы и Филиала № 5 Института биофизики из города Ангарска. Первым на конференции выступил С.Д. Заугольников (рис. 3). Материалы докладов, представленные на конференции, были опубликованы в сборнике, включившем в себя итоги многолетней работы научных сотрудников ФИБ-3.

Учитывая важность экспериментального оборудования для проведения современных токсикологических исследований, С.Д. Заугольников поручил В.А. Кондрашову разработать и организовать создание специальных затравочных камер для изучения избирательного изолированного действия паров, газов и аэрозолей химических веществ при контакте с кожей и органами дыхания. Необходимость в создании этих специальных затравочных камер возникла в связи с острой потребностью токсикологов выполнить требование разработчиков средств индивидуальной защиты человека (СИЗ) по обеспечению ранее не существовавшими, совершенно новыми гигиеническими нормативами: предельно допустимыми концентрациями в воздухе подкостюмного пространства при воздействии паров, газов и аэрозолей на кожу. Эти нормативы позволяют надёжно контролировать защитную эффективность разрабатываемых СИЗ. Заугольников С.Д. с очень большой ответственностью воспринял просьбу разработчиков СИЗ и стал активно решать эту проблему [3, 4].

По нашему техническому заданию и при нашем непосредственном участии Казанским конструкторским бюро «Медфизприбор» в 1968–1969 годах были разработаны и созданы четыре специальные многофункциональные затравочные камеры изолированного кожного и ингаляционного действия КНИД-1 (рис. 4).

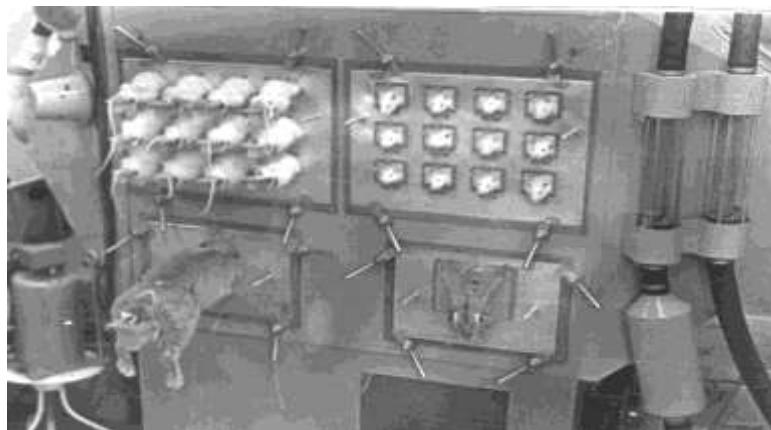


Рис.4. – Камера кожного и ингаляционного действия «КНИД-1», подготовленная для проведения сравнительного изучения изолированного воздействия паров исследуемого вещества на крысах и кроликах через органы дыхания (голова внутри камеры) или через кожу туловища в одном и том же опыте.

На основе конструкторских разработок вышеуказанных затравочных камер Заугольников С.Д. планировал организовать их заводское производство для обеспечения других научно-исследовательских институтов в Москве, Ленинграде, Волгограде, Ангарске и других городах, которое не удалось воплотить в жизнь.

С.Д. Заугольников в конце 70-х годов XX века планировал перевести ФИБ-3 с территории Второго опытного завода ГИПХ на специальную площадку в районе поселка городского типа Кузьмолковский возле расположенной там больницы. На этой площадке планировалось построить необходимое количество зданий в виде изолированного городка. Однако, к большому сожалению, и этот план осуществить не удалось.

До сих пор в ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России и в других научно-исследовательских институтах ученые высоко ценят научный вклад С.Д. Заугольникова и глубоко признательны ему за большую роль в организации масштабных междисциплинарных исследований в медико-биологическом сопровождении опасных и особо опасных химических предприятий.

С.Д. Заугольников сформулировал этапный принцип в системе токсиколого-гигиенических исследований. Под его руководством была разработана и внедрена система текущего и перспективного планирования токсиколого-гигиенических исследований новых опасных и особо опасных химических соединений: от этапа предварительной их оценки до гигиенического регламентирования в объектах производственной и окружающей среды.

Результаты использования и совершенствования этой системы широко освещены в трудах учеников Сергея Дмитриевича и его последователей [5–10]. Так, по инициативе С.Д. Заугольникова в ФИБ-3 впервые стало разрабатываться направление гигиенического нормирования вредных веществ при поступлении в организм через кожу: установление предельно допустимых уровней загрязнения кожного покрова ($ПДУ_{зкп}$) человека [3–4].

Для меня С.Д. Заугольников является образцом настоящего ученого-исследователя, руководителем, оказавшим неоценимую помощь и поддержку в проведении научных исследований по проблеме разработки актуального направления промышленной токсикологии – токсикологической оценки различных химических веществ.

Литература

1. Брехман И.И., Гадаскина И.Д. Николай Васильевич Лазарев: Очерки жизни и деятельности.– Владивосток: Дальнаука, 1993.– 232 с.
2. Вершинина С.Ф. Золотое наследие Н.В. Лазарева.– СПб.: Вектор, 2014.– 160 с.
3. Заугольников С.Д., Кондрашов В.А., Политыкин А.Я. К проблеме предельно допустимых концентраций паров вредных веществ в воздухе

при воздействии на кожу.– В кн.: Общие вопросы промышленной токсикологии: Материалы первой Всесоюзной конференции.– М.,1967.– С. 86-89.

4. Кондрашов В.А. Значение кожного пути поступления химических веществ в организм и профилактика перкутанных отравлений / Под общей редакцией В.Р. Рембовского.– СПб.: ЭЛБИ-СПб, 2014.– 288 с.

5. Кондрашов В.А., Могиленкова Л.А., Нагорный С.В. Организация С.Д. Заугольниковым научных исследований по обеспечению безопасности при производстве и использовании вредных и опасных химических токсикантов.– Сб. трудов: Вопросы обеспечения химической безопасности в РФ / Под общей ред. А.Н. Гребенюка, С.П. Нечипоренко, В.Р. Рембовского, А.С. Радилова.– СПб.: Фолиант, 2007.– С. 12–18.

6. Мусийчук Ю.И. Жизненный и творческий путь С.Д. Заугольникова. // Медицина труда и промышленная экология.– 1993.– №7-8.– С. 1–4.

7. Мусийчук Ю.И. Междисциплинарная организация научных исследований в области оценки окружающей среды.– 1993.– №7-8.– С. 4–9.

8. Мусийчук Ю.И. Сергей Дмитриевич Заугольников – к 90-летию со дня рождения.– Сб. трудов: Вопросы обеспечения химической безопасности в РФ / Под общей ред. А.Н. Гребенюка, С.П. Нечипоренко, В.Р. Рембовского, А.С. Радилова.– СПб.: Фолиант, 2007.– С. 22–29.

9. Рембовский В.Р., Радилов А.С., Могиленкова Л.А. Роль С.Д. Заугольникова в информационном обеспечении работ с опасными химическими веществами.– Сб. трудов: Вопросы обеспечения химической безопасности в Российской Федерации / Под общей ред. А.Н. Гребенюка, С.П. Нечипоренко, В.Р. Рембовского, А.С. Радилова.– СПб.: Фолиант, 2007.– С. 29–31.

10. Творческий путь С.Д. Заугольникова.– Сб. трудов: Вопросы обеспечения химической безопасности в РФ / Под общей ред. А.Н. Гребенюка, С.П. Нечипоренко, В.Р. Рембовского, А.С. Радилова.– СПб.: Фолиант, 2007.– С. 9–11.

ТВОРЧЕСКОЕ НАСЛЕДИЕ С.Д. ЗАУГОЛЬНИКОВА

Ю.И. Мусийчук

Санкт-Петербург, Россия

Анализ творческого наследия профессора С.Д. Заугольникова по официальным спискам работ крайне затруднен по двум основным причинам: во-первых, около половины из них останутся в списках, отражающих деятельность в соответствующих военных лабораториях и кафедрах, что связано со службой в Вооруженных Силах страны и выполнением работ, публикация которых не поощрялась; во-вторых, у руководителя научно-исследовательского учреждения оставалось мало времени для оформления собственных взглядов, обоснования выбранных направлений развития исследований, изложения теоретических взглядов и

новых парадигм. Многие вопросы обсуждались, отрабатывались в личных беседах во время частых командировок, а также при обязательном обсуждении отчетов, перед представлением их на Ученый совет. Так сложилось, что Сергей Дмитриевич в обязательном порядке прочитывал отчеты по токсикологии, а на долю заместителя по научной работе оставались отчеты по гигиене и профпатологии, в выполнении которых приходилось принимать непосредственное участие.

Сразу следует отметить, что развитие того или иного нового направления в работе Сергея Дмитриевича было тесно связано с предшествующей деятельностью, накопленным опытом экспериментальных исследований и организации научных работ. Такой подход позволял принимать прагматичные решения, необходимые при выполнении прикладных исследований при строгом ограничении времени и бесперывном возникновении новых задач, выдвигаемых практикой. В нем отчетливо находила воплощение триада успешного решения поставленной задачи: рождение идеи, нахождение способа ее решения и оценка полученного результата. Трудно было определить в беседе, в какой роли выступал Сергей Дмитриевич в конкретный момент. Только по завершении дела можно было проанализировать, когда рождалась идея, как она реализовывалась и как оценивалась им самим. У него было чутье на новые направления, однако в каждом конкретном случае он принимал решения после обсуждения вопроса с сотрудниками. Запомнился момент обкатки идеи о создании аэродинамического стенда для физического моделирования загрязнений на территории вокруг объектов, предложенной Е.П. Вишневым. Идея была поддержана и нам с Л.В. Трофимовой (опытным гигиенистом) приходилось только корректировать проект Е.П. Вишнева в явно заниженных показателях стоимости этого начинания. К сожалению, с уходом Е.П. Вишнева это перспективное направление заглохло.

Создание научного учреждения медицинского направления С.Д. Заугольников тесно связывал с общим развитием медицинской и биологической науки, новыми и перспективными технологиями, современными направлениями химических исследований. Участие в работе научных советов технологических институтов всегда давало повод для обоснования новых идей и направлений, что обеспечивало практическое внедрение медицинских разработок в практику. Нередко задачи ставились непосредственно на Медицинском координационном научном совете (МКНС), который часто вели одновременно несколько заместителей министров союзных министерств при постоянном участии заместителя министра здравоохранения СССР А.И. Бурназяна. Размах, полет проводимых работ соответствовал величию задач, стоящих перед бурно развивающейся ракетной техникой. Безусловно, многое нельзя было решить без фундаментальных исследований, однако, анализируя первые оценки творчества С.Д. Заугольникова, сделанные четверть века

назад [11,12] с позиций настоящего времени можно отметить, что решение прикладных задач продолжает опережать замедлившиеся особенно в последние годы теоретические фундаментальные изыскания.

Творческое наследие С.Д. Заугольниковца правомерно рассматривать в трех направлениях: общеметодологическом, научном и организационном. Общеметодологические подходы заключались в гуманитарной направленности всей его деятельности. Он неоднократно подчеркивал, что любые медицинские разработки должны быть направлены на пользу людям, человечеству. Экспериментатор, определяющий токсичность вещества и его опасность, гигиенист, оценивающий реальное загрязнение окружающей среды; химик-аналитик, определяющий наличие вещества в биоматериале; наконец, врач, исследующий здоровье рабочего или проживающего в загрязненной зоне населения, должны видеть своей целью благополучие человека. С.Д. Заугольниковца интересовал аспект ответной реакции живого организма или биологической системы как сообщества организмов на неблагоприятные воздействия. Он отдавал себе отчет в ограниченности масштабов проводимых исследований только неблагоприятными ответными реакциями, определяющими основы гигиенического нормирования. Явления гормезиса, акселерации, их значение для развития здоровья, к сожалению, оставались вне внимания, хотя четко прослеживались при исследовании населения. Естественно возникали вопросы методологии действия малых доз, комбинированного действия, которые горячо обсуждались, но не могли реализовываться в полную силу из-за сложности моделей и недостаточности методологических фундаментальных разработок. В сложном вопросе комбинированного действия химических веществ при нормировании быстро распадающихся соединений был выбран подход оценки по наиболее токсичному веществу, что реализовывалось и при гигиенических исследованиях. Попытки реализации этих вопросов в жизни были осуществлены при системной оценке рисков [1, 6].

Одним из важных общеметодологических аспектов в деятельности С.Д. Заугольниковца явилось признание ограниченности токсикологии как только направления по лечению острых отравлений. В докладе, сделанном в конце семидесятых годов в обществе фармакологов и токсикологов, были выдвинуты две парадигмы: серьезности массовых загрязнений окружающей среды, касающихся миллионов людей, и необходимости разработки общей теории токсического действия для понимания и оценки быстро растущего количества химических соединений. Этот доклад вызвал бурную дискуссию, традиционные токсикологи отстаивали идею приоритета острых отравлений. За результаты этого сообщения С.Д. Заугольниковца очень переживал, но позже был вознагражден изменением мнения выступавших, значительно расширивших зону токсикологии (С.Н. Голиков [3]) и попытавшихся обосновать парадигму общего токсического действия. Крупнейшие токсикологи страны (С.Н. Голиков, И.В. Саноцкий

и Л.А. Тиунов) [5], сформулировали проблему, которая практически вылилась в создание классификации токсичности и опасности химических веществ, активное участие в этом процессе принимал и С.Д. Заугольников. Традиционным направлением деятельности военных медицинских специалистов является повышение боеспособности личного состава. С.Д. Заугольников рассматривал это направление, прежде всего, как изменение свойств человеческого организма путем использования естественных стимуляторов с точки зрения комбинированного действия различных факторов. Вместе с тем он четко определил ограниченность этого метода в промышленности, где особое внимание следовало, по его мнению, обратить на лечебно-профилактическое питание рабочих, надежность средств индивидуальной защиты. Использование стимулирующих препаратов исключалось из-за отсутствия данных как часто и как долго их можно принимать, хотя в экстремальных условиях такого рода защиту он не отрицал. Комбинированное действие веществ – многолетний интерес С.Д. Заугольникова, начиная с его кандидатской диссертации [7]. Этот вопрос часто обсуждался в отношении загрязнителей атмосферного воздуха, а также сочетанного действия химических веществ в воздухе и питьевой воде. Однако из-за недостаточности сведений о составе химических соединений в объектах окружающей среды (воздухе, воде) и в пище всегда приходилось соглашаться с выводом С.Д. Заугольникова об ограниченности имеющихся данных и получаемых результатов при выполнении научно-исследовательских работ. При оценках воздействия отдавали предпочтение веществам, которые находились в технологическом процессе. Однако в районах природных геологических аномалий, в которых наблюдали увеличение веществ, встречающихся и в технологическом процессе, в питьевой воде и в пище, он настаивал на учете как производственных, так и природных факторов. Это вылилось в работы по сочетанному действию фторидов в условиях производства и различных уровнях их в питьевых источниках.

При проведении научно-практических исследований С.Д. Заугольников большое внимание уделял предварительной токсикологической оценке химических веществ и поэтапному нормированию в соответствии с промышленным их внедрением. Вместе с инициатором и руководителем разработки данного направления А.О. Лойтом он тщательно отбирал токсикометрические параметры для этой оценки, объемы экспериментального материала, последовательность постановки опытов, формулировки заключений. Логическим продолжением предварительной токсикологической оценки явилось использование расчетных методов определения предельно допустимых концентраций, что обеспечивало этап проектирования производств. Вместе с тем он призывал к «разумному» использованию метода. «Широкое и разумное использование рассматриваемого... метода является одним из решающих путей преодоления несоответствия между сравнительно

ограниченными возможностями медико-гигиенических организаций и необходимостью изучения токсических свойств огромного числа химических веществ, предъявляемых технологами к опытному изучению и широкому внедрению» [10].

Научное обоснование этапности разработки гигиенических нормативов – одно из главных направлений в деятельности С.Д. Заугольников. В частых обсуждениях вопросов нормирования он подчеркивал некоторую неопределенность обоснования норматива, зависящую от выбора методов исследований, однако большой практический опыт нормирования, клинико-гигиеническое подтверждение безопасности устанавливаемых норм, убеждали его в правомочности этого направления. Системные ошибки при нормировании, обусловленные особенностями биологического ответа экспериментальных животных, сопоставимы с неточностями, возникающими при расчетных методах, что также делает их вполне приемлемыми.

С.Д. Заугольников признавал необходимость обоснования кратковременных нормативов для работы в аварийных ситуациях, а также в закрытых помещениях применительно к специальным условиям военного труда. Это направление вылилось в разработку многих нормативов для военно-морского флота, обоснованных В.А. Беляевым и его сотрудниками, а также в разработку аварийных пределов воздействия (Н.И. Калинина, П.Е. Шкодич).

Неоднократно обсуждались вопросы значения токсикологических данных, полученных при нормировании, для клиники. Сергей Дмитриевич соглашался с тем, что для клинических исследований необходимо моделирование хронического отравления, но это затягивает процесс обоснования норматива, резко удорожает исследование, а некоторые токсические процессы не воспроизводятся на животных, ярким примером чего является головная боль, нарушение психической работоспособности.

Очень интересовал С.Д. Заугольникова вопрос канцерогенеза химических соединений. Он придерживался парадигмы пороговости возникновения канцерогенного и других специфических эффектов и отстаивал точку зрения создания безопасных нормативов с учетом отдаленных последствий. Особенно остро обсуждались эти вопросы с Ю.З. Суховым, М.Ф. Савченковым.

Особый взгляд был у С. Д. Заугольникова на хроническое действие химических веществ. Он последовательно отстаивал парадигму динамического развития хронической патологии от стадии неспецифически повышенной сопротивляемости (гормезиса) к функциональным нарушениям и «полому» приспособительных механизмов – болезни. Неоднократно подчеркивалось, что хроническое отравление необходимо рассматривать только в плане исторической взаимосвязи объекта с окружающей средой как динамический процесс, отслеживая его стадийность.

Научный компонент творчества С.Д. Заугольниковова можно проследить по вышедшим брошюрам и книгам. Несомненным существенным вкладом в обеспечение безопасности работ с токсичными компонентами ракетных топлив явились две брошюры «Токсикология жидких ракетных топлив. Лекция» [8] и «Предупреждение отравлений ядовитыми техническими жидкостями» (совместно с А.И. Бекетовым [9]). Вышедшие небольшим тиражом в издательстве Военно-медицинской академии в ряду первых открытых публикаций сотрудников Военно-медицинской академии [2, 8, 9] по ракетным топливам, они были многие годы были практически единственным подспорьем военных врачей по крайне актуальным медицинским вопросам обеспечения безопасности при работе с ракетной техникой, включая обязательное соблюдение гигиенических нормативов.

Аналогичную, прежде всего практическую, направленность имело и одно из первых пособий для врачей медсанчастей по боевым отравляющим веществам, подготовленное С. Д. Заугольниковым совместно с Е.А. Снегиревым, Н.Д. Шульгой и Ю.И. Мусийчуком (1970), в котором нашли отражение не только теоретические знания авторов, но и первые описания острых отравлений у людей. Для врачей, обслуживающих рабочих предприятий по изготовлению фосфорорганических отравляющих веществ (ФОВ), пособие явилось первым источником ознакомления с особенностями их действия. В этом пособии нашло широкое отражение



глубокое понимание С.Д. Заугольниковым механизмов действия ФОВ и реактиваторов холинэстеразы, опубликованное в монографии с С.Н. Голиковым «Реактиваторы холинэстераз» [4] (на титульном листе подаренной мне книги имеется автограф С.Д. Заугольниковова). Вышедшая книга не принесла должной радости С.Д. Заугольникову. Он был приверженцем реактиваторов из группы оксимов, в частности 2-ПАМ-хлорида, но в жесткой конкурентной борьбе предпочтение было отдано более токсичному дипироксиму из группы биспиридиниевых диоксимов. Сергей Дмитриевич предупреждал о

гепатотоксичности выбранного препарата, что было подтверждено экспериментально и клинически, а в конце девяностых годов прошлого столетия привело к замене дипироксима карбоксимом.

Насторожено относился С.Д. Заугольников к использованию профилактических антидотов в условиях производства химических веществ. В беседах мы неоднократно возвращались к вопросу приема перед сменой атропина некоторыми работниками производства хлорофоса и других фторорганических препаратов, осуществляемого по инициативе этих рабочих. Отрицательно относился он и к антидотам профилактического направления в производстве ФОВ, подчеркивая

ограниченность их применения. В условиях производства он считал более важным и перспективным обеспечить надежные средства защиты органов дыхания и кожи.

Системность взглядов С.Д. Заугольников на токсикологию нашла яркое выражение в первой монографии о несимметричном диметилгидразине (1982). Будучи научным редактором и автором токсикологических разделов монографии, он сумел цельно представить исследования токсикологов, гигиенистов, клиницистов, тщательно определив задачи многочисленным соисполнителям и обобщив сведения о токсикологии, гигиене, аналитике, профпатологии и здоровье рабочих производств и населения.

Общеметодологические и научные взгляды С.Д. Заугольников тесно связаны с организационными принципами работы учреждения. Коротко их можно охарактеризовать как комплексность, системность, современность, своевременность (синхронность с запросами повседневной жизни), скорость за счет математического прогнозирования (физического и математического моделирования). В вопросах комплексности он добивался на первых этапах мультидисциплинарности: соединения разделов, выполненных различными специалистами в одной работе. При повышении квалификации специалистов появлялись предпосылки для междисциплинарности, когда различные части работы соединялись в единое целое, отражая системность исследуемого явления. При обсуждении парадигмы рисков (опасности) химических соединений [1] он четко определял их крайнюю условность, неопределенность современных методов их оценки, невозможность принятия решения без результатов наблюдения за людьми, что делает окончательную оценку всегда запоздалой по отношению к необходимости использования того или иного новшества. Для создания парадигмы рисков необходимо длительное накопление практического опыта, очень дорогостоящих программ, особенно при действии факторов слабой интенсивности, комбинированного воздействия. Решение этих задач С.Д. Заугольников сознательно откладывал из-за их сложности и недостаточности научного потенциала. Он подчеркивал необходимость подготовки специалистов с навыками системного анализа, но это требовало специального отбора и длительного времени, что не вязалось с бурным развитием научно-технического прогресса.

Большое место в работах С.Д. Заугольников уделял теоретическому обоснованию этапности гигиенического нормирования химических веществ. Простая интенсификация исследований, (создание новых лабораторий, увеличение числа специалистов) не решала эту задачу. Он видел выход из возникшего тупика в создании системы этапного нормирования в строгом соответствии со степенью внедрения химического вещества, в широком использовании математического прогнозирования, в создании надежных классификаций токсичности и опасности. Взгляды

С.Д. Заугольников отчетливо отражали многие подходы его учителя Н.В. Лазарева и были тесно вплетены в динамику развития токсикологической науки Ленинградской – Санкт-Петербургской школы.

Литература

1. Антонов Ю.П., Заугольников С.Д., Мусийчук Ю.И., Нагорный С.В. Принципы системного подхода к оценке опасности для человека вредных факторов среды // Гигиена и санитария. – 1979. – № 9. – С.63-67.
2. Богданов Н.А. Патология, клиника и терапия поражений жидкими ракетными топливами. – Л., 1970. – 152 с.
3. Голиков С.Н. Актуальные проблемы современной токсикологии // Фармакология и токсикология. – 1981. – № 6. – С. 645-650.
4. Голиков С.Н., Заугольников С.Д. Реактиваторы холинэстераз – Л.: Медицина, 1970. – 168 с.
5. Голиков С.Н., Саноцкий И.В., Тиунов Л.А. Общие механизмы токсического действия. – Л.: Медицина – 1986. – 280 с.
6. Заугольников С.Д. Вопросы планирования токсикологических исследований // Гигиена и санитария. – 1979. – № 11. – С.81-82.
7. Заугольников С.Д. Экспериментальное исследование о комбинированном действии хинина и сульфаниламидных соединений: Автореф... дисс. канд. мед. наук. – Л.: ВММА, 1948.
8. Заугольников С.Д. Токсикология жидких ракетных топлив. Лекция. – Л.: ВМОЛА, 1964.
9. Заугольников С.Д., Бекетов А.И. Предупреждение отравлений ядовитыми техническими жидкостями. – Л.: ВМОЛА, 1962. – 38 с.
10. Заугольников С.Д., Кочанов М.М., Лойт А.О., Стачанский И.И. Экспрессные методы определения токсичности и опасности химических веществ. – Л.: Медицина, 1978. – 184 с.
11. Мусийчук Ю.И. Жизненный и творческий путь С.Д. Заугольникова // Медицина труда и промышленная экология. – 1993. – № 7-8. – С.1-4.
12. Подлесная А.И., Могиленкова Л.А. Хронологический указатель трудов профессора С.Д. Заугольникова // Медицина труда и промышленная экология. – 1993. – № 7-8. – С. 45-47.

АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ТОКСИКОЛОГИИ И ФАРМАКОТЕРАПИИ

ЦИТОПРОТЕКТОРНЫЙ ЭФФЕКТ ЭНДОГЕННОГО АГОНИСТА АРИЛГИДРОКАРБОНОВОГО РЕЦЕПТОРА ПРИ ТОКСИЧЕСКОМ ДЕЙСТВИИ БЕНЗ(А)ПИРЕНА В КЛЕТКАХ ГЕПАТОМЫ ЧЕЛОВЕКА ЛИНИИ HepaRG

В.Н. Бабаков, Н.Ю. Роговская, И.Д. Курдюков, П.П. Бельтюков,
С.А. Дулов, А.С. Радилов

ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия
babakov@rihophe.ru

Введение. Полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) являются опасными стойкими антропогенными загрязнителями объектов окружающей среды, обладают канцерогенным, мутагенным и тератогенным действием [3].

Бенз(а)пирен (далее ВР) – один из наиболее распространенных ПАУ, образующийся при горении органического сырья, его содержание в объектах окружающей среды нормируется уровнем ПДК. Для проявления токсических свойств ВР требуется пройти метаболическую активацию; с помощью ферментной системы цитохромов Р450 из химически инертного ВР образуются химически активные диолэпоксиды ВР, которые могут взаимодействовать с белками и нуклеиновыми кислотами клетки. Изучение механизмов токсического действия ВР и других ПАУ остается актуальной задачей из-за очень широкого их распространения как стойких экологических загрязнителей.

Арилгидрокарбонный рецептор (AhR) является одной из мишеней токсического действия ПАУ. Так, у мышей, нокаутированных по гену AhR, отсутствуют канцерогенные эффекты ВР [5]. Также имеются сведения о способности ВР активировать провоспалительный транскрипционный фактор NF-κB, контролирующий экспрессию цитокинов [1].

Кроме того, в настоящее время известно, что клеточная линия HepaRG является единственной доступной иммортализованной линией, экспрессирующей цитохром Р450 на уровне, сопоставимом с экспрессией этого же типа ферментов в гепатоцитах человека [5]. В связи с этим она может быть использована в токсикологическом эксперименте для изучения цитотоксического эффекта различных ПАУ.

Цель работы состояла в оценке влияния высокоаффинного эндогенного агониста AhR – непептидного димера триптофана (5,11-дигидроиндоло[3,2-*b*]карбазол-6-карбоксальдегид, FICZ, K_d=70 пМ) на базовую токсичность ВР, обусловленную активацией транскрипционного фактора NF-κB в клетках гепатомы человека линии HepaRG.

Материалы и методы. Оценивали активацию ключевых внутриклеточных маркеров сигнального пути NF-κB, изменения в составе

цитокинового секретора и базовой цитотоксичности при действии ВР и при совместном действии ВР и FICZ. Клетки линии HeparRG (Gibco) культивировали во флаконах в среде Вильямса Е с добавлением 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота, средовых добавок инсулина и гидрокортизона, антибиотиков стрептомицина-пенициллина при 37 °С в CO₂-инкубаторе в атмосфере 5% CO₂.

Для определения интегральной цитотоксичности с помощью оборудования xCelligence RTCA, 10 тыс. клеток вносили в лунку специализированного планшета, позволяющего определять клеточный индекс в режиме реального времени и культивировали в полной среде Вильямса. На следующий день после пассажа добавляли в среду различные концентрации ВР и FICZ. Мониторинг клеточного индекса проводили в течение 3 дней после добавления токсиканта.

Для получения данных по определению активированных молекулярных маркеров сигнального пути NF-κB клетки культивировали в 24-луночных планшетах, промывали на следующий день после пассажа, добавляли в среду, содержащую ВР и FICZ в различных концентрациях, или активатор NF-κB – липополисахарид (LPS) из *S. typhosa* и инкубировали 72 часа. Маркеры сигнального пути были проанализированы в клеточных лизатах с использованием многопараметрической иммунофлуоресцентной технологии Luminex xMAP.

Для получения кондиционных сред клетки высевали в 24-луночные планшеты в количестве 500 тыс./лунку, культивировали в полной среде, на следующий день клетки промывали раствором Хенкса и добавляли 1 мл в лунку полной среды, содержащей 10 мкМ ВР, 1 нМ FICZ, смесь 10 мкМ ВР и 1 нМ FICZ, 1 мкг/мл LPS. Клетки инкубировали 4 суток с ежедневным отбором 100 мкл среды. Концентрации 48 цитокинов, хемокинов и факторов роста в кондиционных средах были проанализированы с использованием многопараметрической иммунофлуоресцентной технологии Luminex xMAP (Bio-Plex 200, Bio-Rad) и наборов Bio-Plex Pro Human Cytokine 27-plex и 21-plex (Bio-Rad).

Результаты и их обсуждение. Одним из базовых способов интегральной оценки биологической активности различных соединений является оценка пролиферации и темпов роста популяции, а также цитотоксичности клеток на фоне действия тех или иных соединений. С помощью измерения электрического импеданса (полного сопротивления) поверхности клеток можно в реальном времени интегрально с использованием клеточного индекса оценивать целый ряд показателей: скорость роста и пролиферации культуры, степень адгезии и распластывания на подложке, активацию рецепторов и т.п. Оборудование для оценки импеданса монослойной адгезионной культуры использует планшеты с нанесенными электродами на культивируемой поверхности, что позволяет измерять импеданс в реальном времени.

При действии ВР в диапазоне концентраций 0,5-50 мкМ происходит

снижение клеточного индекса дозозависимым образом. IC₅₀ установлен на уровне 7,4 мкМ (рис. 1). Добавление 1 нМ FICZ к такой же серии разведений ВР снижает IC₅₀ практически в 2 раза до 15 мкМ. На рисунке 1 представлен график нормализованного клеточного индекса от времени при действии на клетки НераRG 10 мкМ ВР, 1 нМ FICZ и их смеси. Уровень усредненного клеточного индекса смеси ВР и FICZ ниже клеточного индекса при действии только FICZ, но выше, чем при действии ВР (рисунк 1).

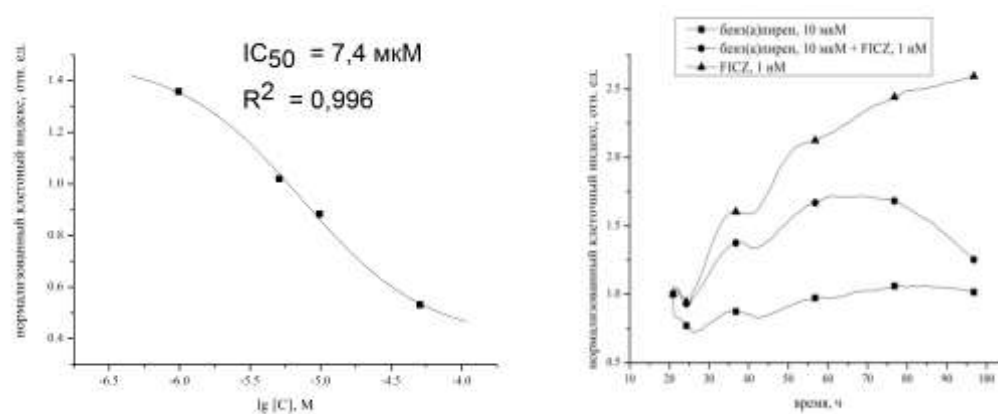


Рис. 1. – График зависимости нормализованного клеточного индекса от логарифма концентрации бенз(а)пирена на клетки линии НераRG и график зависимости нормализованного клеточного индекса от времени при действии на клетки 10 мкМ бенз(а)пирена, 1 нМ FICZ и их смеси.

При оценке активации транскрипционного фактора NF-κB использовали набор для определения внутриклеточных маркеров активации сигнального пути NF-κB. В норме транскрипционный фактор NF-κB в неактивном состоянии находится в форме гомо- или гетеродимера субъединиц p65(RelA) и p50 в цитоплазме в комплексе с ингибиторной субъединицей IκB-α. Ингибиторная субъединица при действии активаторов NF-κB, например, при активации рецептора TNFR1 фактором некроза опухолей, фосфорилируется ИКК комплексом и деградирует в протеосомах. Активный димер затем мигрирует в ядро, где регулирует экспрессию ряда генов, в том числе, и генов цитокинов [5].

Можно отметить долговременную активацию (фосфорилирование Ser177/Ser181) ИКК a/b комплекса при действии ВР и при совместном действии ВР и FICZ, а действие рецепторного активатора NF-κB – LPS через 72 часа уже не отличается от контроля. Действие ВР, а также совместное действие ВР и FICZ приводит к снижению уровня экспрессии рецептора к фактору некроза опухолей (TNFR1) – одного из основных рецепторов сигнального пути NF-κB (рис. 2). Кроме рецепторного пути активации, транскрипционный фактор NF-κB может активироваться и при развитии окислительного стресса, а также продуктами перекисного окисления липидов, что, вероятно, и происходит при метаболической

активации ВР. FICZ не влияет на активацию внутриклеточных киназных каскадов этого сигнального пути.

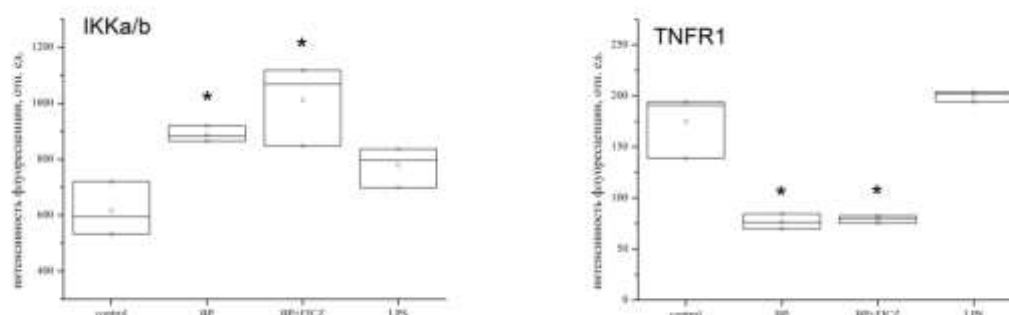


Рис. 2. – Уровень фосфорилирования ИКК комплекса и содержания рецептора фактора некроза опухолей (TNFR1) через 72 ч при действии ВР, смеси ВР и FICZ, и липополисахарида из *S. typhosa*. * $p < 0,05$ (ANOVA).

Генными мишенями транскрипционного фактора NF-κB являются гены цитокинов, поэтому оценили уровень секреции 48 цитокинов в кондиционную среду клеток HepaRG при действии ВР, FICZ, смеси ВР и FICZ и липополисахарида из *S. typhosa*. Положительный контроль (липополисахарид) через активацию TLR рецептора и его сигнального пути NF-κB повышал секрецию провоспалительных цитокинов в 5-10 раз. В клетках гепатомы значительно увеличивалась секреция основных маркеров бактериального сепсиса – цитокинов IL-6, IL-8, хемокинов MCP1(MCAF), IP-10, RANTES, GROα, колонийстимулирующих факторов G-CSF, GM-CSF.

Бенз(а)пирен достоверно повышал уровень секреции ряда провоспалительных цитокинов в кондиционную среду, но уровень секреции был существенно меньше, чем у LPS. При действии на клетки ВР повышалась секреция IL-6, IL-9, IL-10, IL-12(p70, p40), IL-15, факторов роста G-CSF, GM-CSF, HGF, VEGF, MIF, LIF, RANTES, CSF, MIP1a. Уровень повышения секреции регуляторных белков был статистически значимо 2-3 кратным по сравнению с контролем. Для ряда цитокинов была отмечена разнонаправленная динамика секреции по сравнению с LPS, например, LPS не активирует секрецию IL-12 и VEGF (рис. 3).

При действии на клетки ВР отмечается подавление секреции по сравнению с контролем таких регуляторных белков как GRO-α, M-CSF и SCGFβ. Агонист арилгидрокарбонового рецептора FICZ достоверно снижает секрецию IL-6 и IL-12, вызванную ВР, но на большую часть повышенной секреции цитокинов, вызванной ВР, влияния не оказывает. Это соединение самостоятельно также может незначительно повышать секрецию ряда цитокинов. Основные варианты изменений секреции цитокинов при действии ВР, FICZ, смеси ВР и FICZ и липополисахарида из *S. typhosa* приведены на рисунке 3.

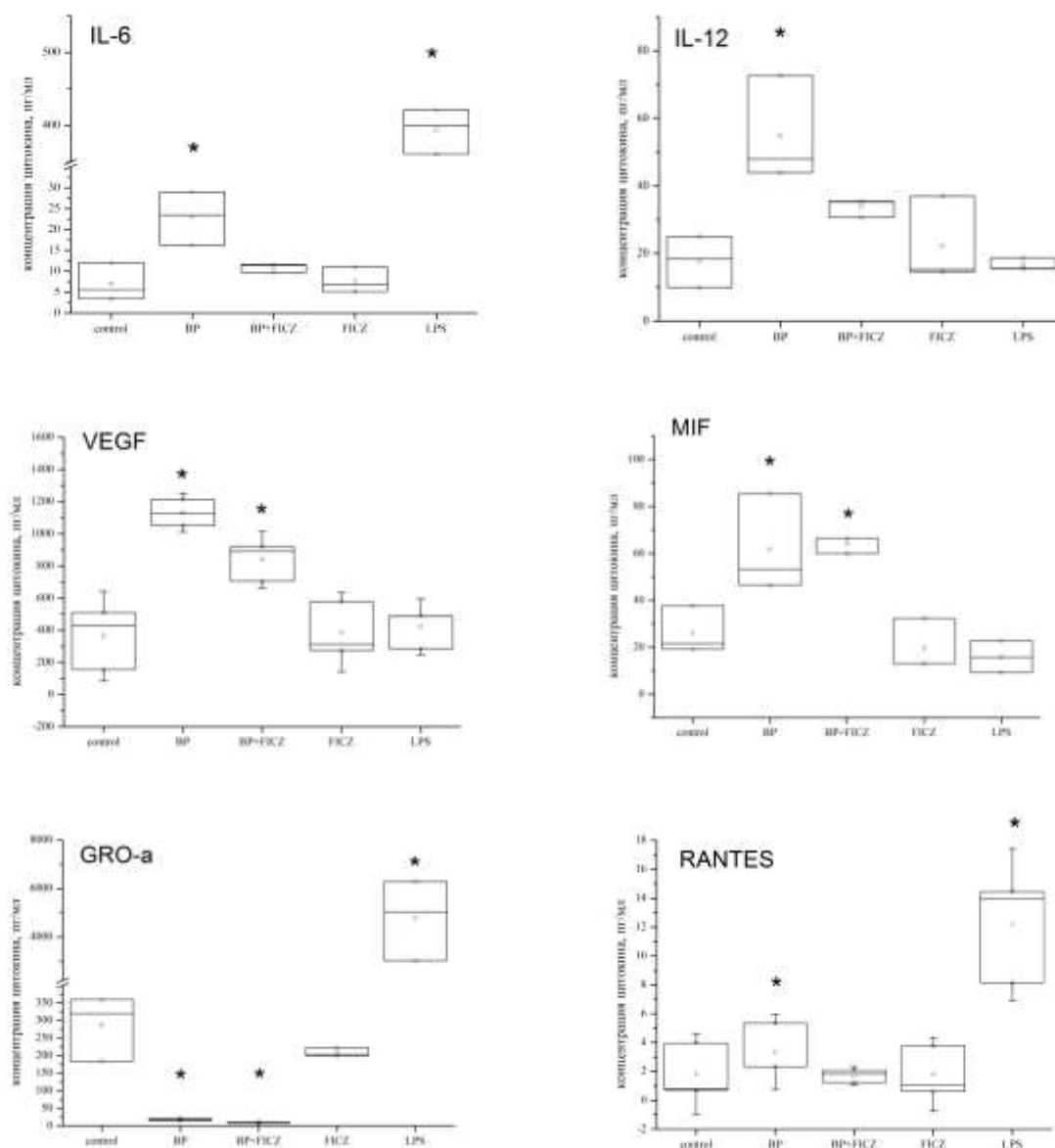


Рис. 3. – Ящичная диаграмма уровня секреции цитокинов в кондиционную среду при действии BP, смеси BP и FICZ, и липополисахарида из *S. typhosa*; * $p < 0,05$ (ANOVA).

FICZ не оказывает существенного влияния на цитоплазматическую активацию сигнального пути NF- κ B, но влияет на некоторые белковые продукты, контролируемые этим транскрипционным фактором. Можно предполагать, что эндогенный агонист арилгидрокарбонового рецептора FICZ может конкурировать за рецептор с полиароматическими углеводородами и, соответственно, за транспорт комплекса лиганд-рецептор в ядро (разница в эффективных концентрациях между BP и FICZ составляет 4 порядка), где метаболически активированные ПАУ проявляют свое генотоксическое и мутагенное действие.

Таким образом, высокоаффинные агонисты AhR могут проявлять

протекторное действие при действии ПАУ. Целесообразно в дальнейшей работе проверить цитопротекторный эффект агонистов AhR по влиянию на активацию внутриядерной системы репарации ДНК как маркеров генотоксического действия ПАУ.

Литература

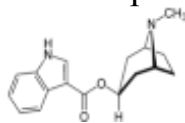
1. Волков М.С., Кобляков В.А. Активация транскрипционного фактора NF-κB в клетках гепатом под действием канцерогенных полициклических ароматических углеводов // Цитология – 2011. – Т. 53(5). – С. 418–422.
2. Lübberstedt M., Müller-Vieira U., Mayer M. et al. HepaRG human hepatic cell line utility as a surrogate for primary human hepatocytes in drug metabolism assessment in vitro // J. Pharmacol. Toxicol. Methods. – 2011. – V. 63(1). – P. 59–68.
3. Moffat I., Chepelev N., Labib S. et al. Comparison of toxicogenomics and traditional approaches to inform mode of action and points of departure in human health risk assessment of benzo[a]pyrene in drinking water // Crit. Rev. Toxicol. – 2015. – V. 45(1). – P. 1–43.
4. Puga A., Ma C., Marlowe JL. The aryl hydrocarbon receptor cross-talks with multiple signal transduction pathways. // Biochem Pharmacol. – 2009. – V. 77(4). – P.713–722.
5. Shimizu Y., Nakatsuru Y., Ichinose M. et al. Benzo[a]pyrene carcinogenicity is lost in mice lacking the aryl hydrocarbon receptor. // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2000. – V. 97(2). – P.779–782.

РАЗРАБОТКА ПЕРСПЕКТИВНЫХ ПРОТИВОРВОТНЫХ СРЕДСТВ НА ОСНОВЕ ДИМЕТПРАМИДА

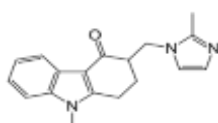
Д.В. Криворотов, В.Е. Соболев, В.А. Кузнецов, А.С. Радилов, С.А. Дулов
ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия
denhome@bk.ru

Многие факторы химической и физической природы, с которыми сталкивается медицина экстремальных состояний, приводят к развитию у пострадавших эметического синдрома.

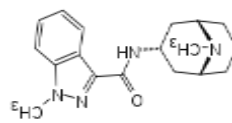
Последние десятилетия характеризуются большими достижениями в фармакологии, в том числе и в расширении числа препаратов, обладающих противорвотной активностью. Многие из этих фармакологических средств применимы при химических и лучевых поражениях организма человека:



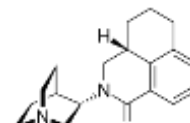
трописетрон
(Новобан)



ондансетрон
(Зофран)

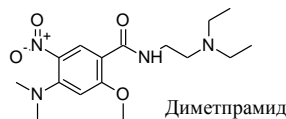


гранисетрон
(Китрил)



палонсетрон
(Оницит)

Оригинальным отечественным противорвотным лекарственным препаратом являлся диметпрамид, селективный блокатор центральных допаминовых рецепторов [1]



Диметпрамид служил основой кластера противорвотных средств и радиопротекторов, применяемых при воздействии ионизирующего излучения, а также после лучевой и химиотерапии. Лекарственные препараты на его основе выпускали в виде таблеток и растворов для инъекций (ампул и шприц-тюбиков).

В настоящее время промышленное производство препаратов диметпрамида утрачено, в том числе и его комбинированных средств Диметкарб и Диксафен, адекватной замены которым на сегодня в Российской Федерации нет. Поэтому создание современной химико-фармацевтической технологии производства противорвотных средств на основе диметпрамида представляет практический интерес.

В рамках решения этой задачи была разработана оригинальная технология получения субстанции и готовой лекарственной формы диметпрамида гидрохлорида, а также разработана его новая химическая форма в виде диметпрамида сукцината [3,4].

Возможность химического синтеза субстанции диметпрамида определяется успехом получения его ключевого интермедиата - 4-диметиламино-5-нитро-о-анисовой кислоты (рис. 1).

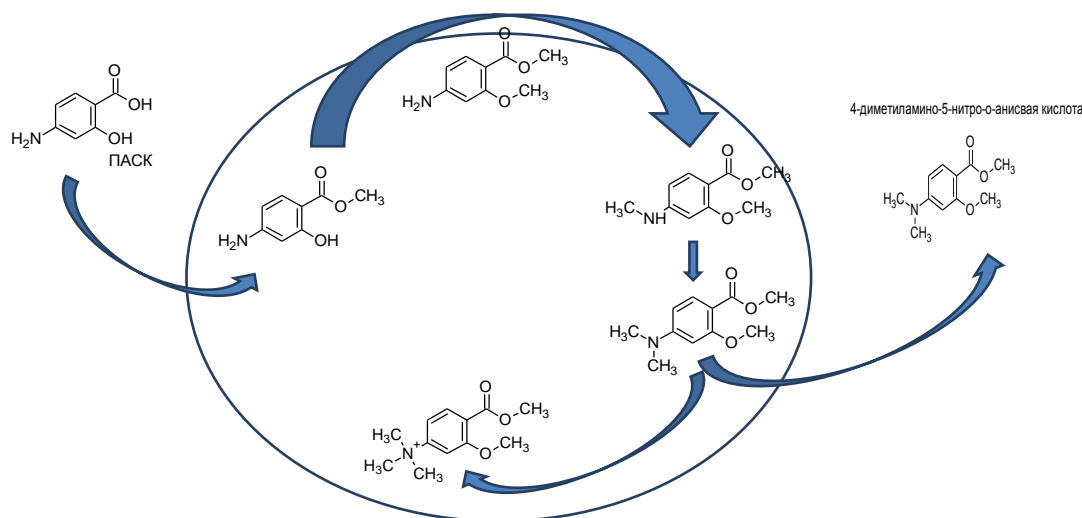


Рис. 1. – Схема синтеза 4-диметиламино-5-нитро-о-анисовой кислоты из 4-аминосалициловой кислоты (ПАСК).

Разработанный метод неполного алкилирования 4-аминосалициловой кислоты обеспечил получение ключевого полупродукта с выходом в 80-90% и с высокой степенью чистоты, несмотря на образующиеся в ходе синтеза промежуточные и побочные продукты.

Решение сложной задачи синтеза, позволило разработать современную химико-фармацевтическую технологию получения диметпрамида и его сукцината в виде таблеток 20 мг в плёночной оболочке [1].

Медико-биологические испытания полученных пероральных лекарственных форм диметпрамида и его сукцината показали перспективы медицинского применения этих фармакологических средств. Для сравнительного изучения противорвотной активности использовали модель апоморфин-индуцированной рвоты у собак. Препаратом сравнения были выбраны таблетки антиэметика ондансетрона, 4 мг (Германия), показанные при тошноте и рвоте, вызванной химио- или лучевой терапией. Доза испытываемых таблеток препаратов диметпрамида (20 мг) соответствовала дозе, описанной в справочнике «Лекарственные средства» [2].

Тест-система – здоровые беспородные собаки обоего пола, получавшие перорально таблетку испытуемого фармакологического средства перед подкожным введением эметика – апоморфина. У собак, получивших подкожно апоморфин в дозе 0.1 мг/кг и не получивших лечения, наблюдалась многократная рвота в течении 30 минут (рис. 2). Прием ондансетрона оказал определенное защитное действие. Количество актов рвоты на одно животное было меньшим, чем в контрольной группе. В группе собак, принимавших таблетки диметпрамида гидрохлорида, актов рвоты и позывов к ней не отмечено ни у одной из шести наблюдавшихся собак. В группе собак, принимавших таблетки диметпрамида сукцината, среднее число актов проявления рвотного рефлекса было незначительно. Акты рвоты в данной группе наблюдались только у 2 собак принимавших апоморфин повторно.

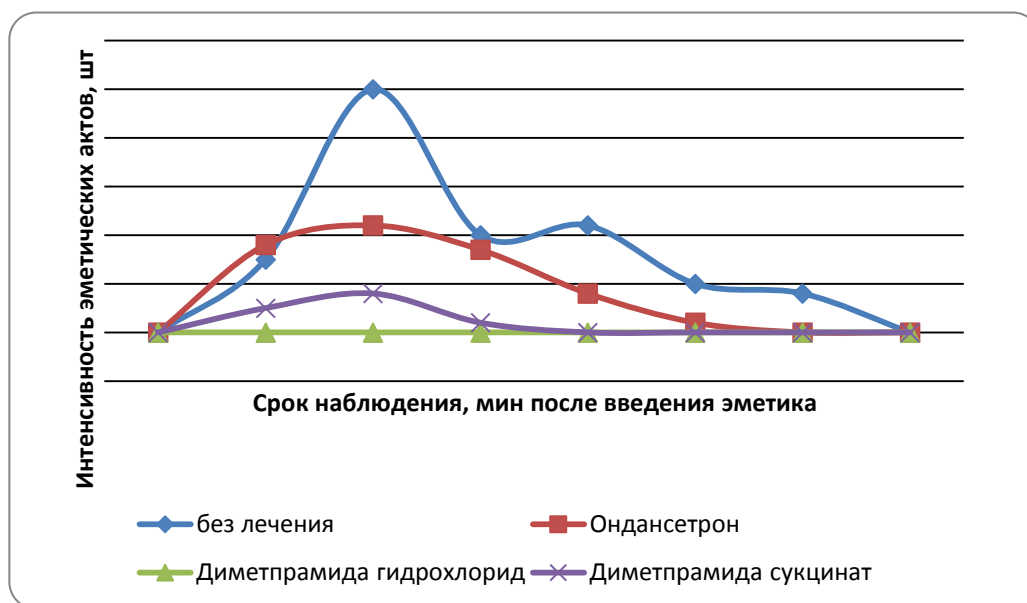


Рис. 2. – Среднегрупповые результаты регистрации количества актов рвоты у собак после введения апоморфина и фармакологических средств.

Полученные результаты позволяют рекомендовать продолжить доклиническое исследование препаратов диметпрамида в соответствии с Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств [5] для цели разработки и регистрации лекарственных препаратов, предназначенных для лечения рвоты, вызываемой воздействием цитостатических препаратов и ионизирующего излучения, в том числе в интересах военной медицины.

Литература

1. Криворотов Д.В., Кузнецов В.А. и др. Диметпрамид. Инновация или деградация? // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2015. – Т.13. – С. 84.
2. Машковский М. Д. Лекарственные средства. 16-е изд., перераб., испр. и доп. – М.: Новая волна, 2012. – 1216 с.
3. Пат.SU1022360, СССР. Противорвотное средство Диметпрамид / Т.К. Джаракьян, О.М. Лернер и др.; опубл. 30.12.83, Бюл. № 48. – 2 с.
4. Пат.SU387979, СССР. Способ получения 4-диметиламино-5-нитро-о-анисовой кислоты / О.М. Лернер, Я.Л. Костюковский; опубл. 22.06.73. Бюл. № 28. – 2 с.
5. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / Под ред. А.Н. Миронова. — М.: Гриф и К, 2012. – 944 с.

РОЛЬ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ДОБАВОК К ПИЩЕ В ПРОФИЛАКТИКЕ ПРОФЕССИОНАЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

В.А. Кузнецов, А.С. Радиллов, С.А. Дулов, М.И. Поддубная,
Д.В. Криворотов

*ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия
denhome@bk.ru*

Разработка медико-гигиенических основ медицины труда и окружающей среды, лечебно-профилактических и других мер обеспечения химической безопасности является ведущим направлением научно-исследовательских работ ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России [1, 2].

Профилактика химически обусловленных и соматических заболеваний, продление возраста трудоспособности персонала химически опасных объектов требуют обеспечения высокого уровня жизни, в том числе качества питания [3].

Структура питания современного человека с избытком углеводистой и калорийной пищи, приводит к наблюдению у обследуемых Институтом контингентов дефицита витаминов, микроэлементов, белка, полиненасыщенных жирных кислот, которые могут отягощаться вредными производственными и экологическими факторами.

Для обогащения рациона питания недостающими витальными элементами обоснована необходимость применения биологически

активных добавок к пище (БАД) с использованием различных компонентов природного происхождения с целью активации защитных сил организма человека.

С этой целью, проводится разработка теоретико-экспериментальных и технологических подходов к созданию научно-обоснованных комплексов БАД к пище для применения в области профпатологии и спортивной медицины на основе пивных дрожжей, белковых гидролизатов, пептидных комплексов, витаминов и аминокислот.

Разработанные продукты – БАД к пище «ЭкоПроф», «ПептоПроф» и «ПептоПроф» прошли экспертизу соответствия требований технических регламентов таможенного союза и получили соответствующие свидетельства о государственной регистрации.

БАД к пище «ЭкоПроф» предназначен для повышения резистентности организма к тяжелым условиям труда, обусловленным вредным химическим фактором. БАД к пище «ПептоПроф» предназначен для применения при умственном и физическом перенапряжении, операторской деятельности и других интенсивных нагрузках, сопровождающихся хронической усталостью и утомляемостью. БАД к пище «ПептоПроф» предназначен для применения при интенсивных физических нагрузках в условиях воздействия вредного производственного фактора.

Реализованный подход к разработке БАД может быть адаптирован к профилактике донозологических и профпатологических состояний, возникающих при различных видах профессиональной деятельности, с учетом особенностей изменения гомеостаза организма, выявляемых специалистами института в ходе комплексных медико-гигиенических исследований предприятий с вредными и тяжелыми условиями труда.

Литература

1. Рембовский В.Р. Радилев А.С., Могиленкова Л.А. Деятельность ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России в системе Федерального медико-биологического агентства // Медицина экстремальных ситуаций. – 2014. – №3 (49). – С. 18-23.
2. Санитарно-эпидемиологическое обеспечение химической безопасности производственной и окружающей среды». Руководство / Под ред. М.Ф. Киселева, В.Р. Рембовского, В.В. Романова // М.: ООО «Комментарий», 2012. – 476 с.
3. Рембовский В.Р., Могиленкова Л.А. Естественные процессы детоксикации химических веществ, загрязнителей среды обитания человека // Биомедицинский журнал. – Medline.ru. – 2015. – №16. – С. 216-239.

ВЛИЯНИЕ ДИМЕТПРАМИДА СУКЦИНАТА НА ИЗОЛИРОВАННОЕ СЕРДЦЕ КРЫСЫ. РОЛЬ ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ ДОФАМИНОВЫХ И СЕРТОНИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ

Д. С. Лаптев, С. Г. Петунов, Д. В. Бобков, А.С. Радиллов
ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия
lapden@mail.ru

Введение. Поиск эффективных антиэметиков, способных купировать тошноту и рвоту (наиболее тяжелые первичные реакции при радиационном и химическом поражении), представляет собой актуальную задачу при разработке и реализации мероприятий по защите населения в случае возникновения аварийных ситуаций [4].

Используемые в клинике препараты с выраженным противорвотным действием из класса нейролептиков вызывают ряд нежелательных побочных эффектов, связанных с нарушением катехоламинергической синаптической медиации в базальных ганглиях и других подкорково-стволовых образованиях головного мозга (слабость, сонливость, гипокинезия, мышечная ригидность, различные виды дискинезии). Применение с этой целью производных бензамида (метоклопрамида, противорвотное действие которого связано с блокадой центральных дофаминовых и серотониновых рецепторов), может провоцировать экстрапирамидные расстройства, головную боль, гормональные нарушения, аритмии и остановку сердца [7]. Структурным аналогом метоклопрамида является диметпрамид, обладающий противорвотным действием, однако приводящий к риску возникновения побочных эффектов в существенно больших дозах [2].

Цель работы: изучить влияние новой солевой формы ДМП – сукцината (ДМПс) на сократительную функцию изолированного сердца крысы и определить роль периферических дофаминовых и серотониновых рецепторов в реализации его эффектов.

Материалы и методы. В качестве объекта исследования использовали изолированное сердце самцов нелинейных белых крыс ($m=300\pm 50$ г). Эвтаназию проводили методом цервикальной дислокации. Методика исследования подробно описана в предыдущих работах [1].

При выполнении широкого доступа применяли билатеральную трансабдоминальную торакотомию. Сразу после извлечения сердца из грудной полости его помещали в холодный ($+4^{\circ}\text{C}$) физиологический раствор Кребса-Хензелейта (в мМ): NaCl – 118,99; KCl – 4,69; NaHCO_3 – 25; KH_2PO_4 – 1,18; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 1,17; $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 2,5; EDTA – 0,03; $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ – 5,5. Аорту фиксировали к канюле перфузионной установки Langendorff System (Panlab, Испания) зажимом типа «крокодил», а затем лигатурами. Перфузию сердца осуществляли через канюлю, закрепленную в аорте, при этом перфузат ретроградно поступал в левый желудочек. В качестве перфузата использовали подогретый до 37°C и насыщенный карбогеном раствор Кребса–Хензелейта. Перфузат подавали в режиме

постоянного протока из расчета 10 мл в минуту на один грамм сырого веса сердца. В качестве контроля адекватности перфузии служит давление (не менее 50 мм рт.ст.) в контуре «насос – аортальная канюля» [3].

Величину давления в левом желудочке определяли катетером с полиэтиленовым баллоном. Параметры сократительной активности сердца записывали системой PowerLab Data acquisition system 8/30 (ADInstruments, Новая Зеландия) с последующей обработкой в программе «LabChartProUpgrade 7.0». Регистрировали объемную скорость коронарной перфузии (КП), давление перфузии (ДП), давление в левом желудочке, пульсовое давление (ПД), конечное диастолическое давление (КДД), частоту сердечных сокращений (ЧСС). Дополнительно рассчитывали интегральный показатель минутной производительности левого желудочка сердца ($Int_{1\text{мин}}$) и индекс сократительной функции ($ИСФ=ПД \times ЧСС$). Действие препарата на состояние проводящей системы изолированного сердца оценивали по ЭКГ, которую регистрировали в течение 30 минут с использованием электродов: референтный закрепляли на металлической канюле установки, отрицательный – в области правого ушка сердца, положительный – в области левого желудочка ближе к верхушке сердца.

Для определения влияния ДМПс на сердечный ритм при анализе ЭКГ рассчитывали % экстрасистол. За экстрасистолу принимали сокращение с RR интервалом, продолжительность которого превышала среднее значение плюс три стандартных отклонения ($M+3\sigma$).

Стабилизационный период, в течение которого происходила адаптация изолированного сердца к экспериментальным условиям, составлял 30 минут, после чего снимали показатели сократимости, которые принимались за фоновые. Затем добавляли в перфузат тестируемые вещества. В качестве контроля использовали параметры работы интактного сердца перфузируемого раствором Кребса-Хензелейта. Исследовали влияние ДМПс на параметры сократительной активности изолированного миокарда крысы в диапазоне концентраций 1×10^{-5} – 1×10^{-3} М. Выбор действующих концентраций определялся, исходя из дозы диметпрамида гидрохлорида, рекомендованной для применения у человека (20 мг): концентрация 1×10^{-4} М соответствует его содержанию в крови человека при пероральном приеме 2 мг/кг при биологической доступности 70 %. Продолжительность воздействия на сердце каждой концентрации составляла 10 минут. Поскольку одним из наиболее вероятных механизмов действия ДМП является блокада D_2 -рецепторов триггерной зоны рвотного центра головного мозга [2], для определения роли периферических дофаминовых рецепторов в реализации эффектов ДМПс на изолированном сердце мы использовали неселективный агонист дофамин (ДА) (Sigma Aldrich, США). ДА, обладающий большей аффинностью по отношению к D_2 -рецепторам, использовался в концентрации $6,2 \times 10^{-6}$ М, что соответствует EC_{50} для положительного инотропного эффекта [5]. Дофамин добавляли в перфузионный раствор после 10 минут экспозиции

сердца с ДМПс, что определялось скоростью формирования сосудистых реакций на действие вазоактивной субстанции [1]. По истечении 20 минут воздействия вновь фиксировали регистрируемые показатели. Аналогичной схемы мы придерживались в экспериментах с неселективным агонистом 5HT-рецепторов 5-hydroxytryptamine creatinine sulfate monohydrate (5HT) (Sigma Aldrich, США) в концентрации 1×10^{-6} М [8]. EC_{50} для увеличения кальциевого тока изолированных предсердий человека равен 1×10^{-7} М [6]. При анализе результатов оценивали динамику параметров работы сердца по сравнению с фоновыми значениями, а также проводили сравнение показателей сократимости интактного миокарда и на фоне действия агонистов. Статистическую обработку проводили в программе «GraphPad Prism 5.04». Для сравнения результатов при нормальном распределении данных использовали t-критерий Стьюдента, при распределении данных отличным от нормального, применяли T-критерий Вилкоксона для связанных выборок, а для выявления межгрупповых различий применяли U-критерий Манна-Уитни. Статистически значимыми считались различия при $p \leq 0,05$.

Результаты исследования. В ходе экспериментальной работы показано снижение параметров сократительной активности миокарда под действием ДМПс (табл. 1).

Таблица 1. – Влияние ДМПс на функциональные показатели изолированного сердца крысы в зависимости от концентрации, % от фоновых значений (n=10, M±SE)

Перфузат	ДП	Int (1м)	ЧСС	ПД	ИСФ	КДД
Контроль	99,2± 1,8	99,4± 2,2	98,7± 4,1	103,0± 4,1	101,0± 2,8	100,1± 3,2
ДМПс 10^{-5} М	97,9± 2,2^	95,8± 0,9*^	91,3± 2,7*^	103,0± 1,7	95,1± 1,6*^	106,6± 2,6*
ДМПс 10^{-4} М	106,9± 2,3*#	74,5± 2,5*#	69,0± 4,2*#	97,0± 5,3	65,4± 2,3*#	98,7± 4,0
ДМПс 10^{-3} М	–	–	–	–	–	–

Примечание: * – статистически значимое отличие от фона при $p \leq 0,05$; # – статистически значимое отличие от контроля при $p \leq 0,05$; ^ – статистически значимое эффекта ДМПс в дозе 1×10^{-4} М от эффекта в дозе 1×10^{-5} М при $p \leq 0,05$. Время экспозиции с ДМПс – 10 минут.

Его применение в концентрации 1×10^{-4} М приводит к выраженному падению ЧСС на 31% ($p \leq 0,05$), что на фоне стабильного показателя ПД приводит к значительному (на 34,6 %, $p \leq 0,05$) снижению ИСФ и минутной производительности сердца (на 25,5 %, $p \leq 0,05$). Установлено вазоконстрикторное действие ДМПс на коронарное русло, о чем

свидетельствует статистически значимое в сравнении с контролем повышение ДП на 6,9 %. Влияние ДМПс на параметры работы изолированного сердца в концентрации 1×10^{-5} М выражено в меньшей степени и носит характер тенденции. Однако увеличение концентрации препарата до 1×10^{-3} М вызывало остановку сердца уже в первые минуты эксперимента. В связи с этим установленным фактом последующие эксперименты по выявлению возможных механизмов периферического действия ДМПс проводились с применением его в концентрации 1×10^{-4} М.

Отрицательный хронотропный эффект ДМПс сопровождается снижением количества экстрасистолических сокращений в среднем с 1,8 % в контрольной серии до 0,81% в эксперименте ($p \leq 0,05$).

Неселективный агонист дофаминовых рецепторов дофамин в концентрации $6,2 \times 10^{-6}$ М обладает стимулирующим влиянием на сердечную мышцу. В наших экспериментах (табл. 2) показано значительное статистически значимое по сравнению с контролем увеличение ЧСС на 51,9 %, приводящее к увеличению ИСФ и минутной производительности миокарда на 48,4 % и 8,5 % соответственно.

Таблица 2 – Влияние дофамина (ДА) на изолированное сердце крысы в присутствии ДМПс, % от фоновых значений (n=10, M±SE)

Перфузат	ДП	Int (1м)	ЧСС	ПД	ИСФ	КДД
Контроль	99,8± 1,8	94,5± 2,9	91,6± 3,4*	101,5± 3,4	92,8± 3,0*	107,1± 9,2
ДМПс 10^{-4} М	109,6± 2,6*#^	69,7± 2,4*#^	67,6± 3,9*#^	93,7± 3,8^	62,5± 2,7*#^	110,7± 8,6
ДМПс 10^{-4} М + ДА 10^{-6} М	89,4± 4,3*	83,2± 2,0*#	124,2± 4,6*#	78,6± 3,1*#	96,8± 2,9	109,4± 15,8
ДА 10^{-6} М	78,0± 7,3#*	108,5± 4,8#	151,9± 5,1#*	95,2± 5,6	148,4± 5,9#*	83,3± 7,7

Примечание: * – статистически значимое отличие от фона при $p \leq 0,05$; # – статистически значимое отличие от контроля при $p \leq 0,05$; ^ – статистически значимое отличие от ДМПс+ДА при $p \leq 0,05$. Время экспозиции – 30 минут. Отсечка данных в эксперименте с ДА сделана через 20 минут.

При этом давление перфузии достоверно снижалось на 22% ($p \leq 0,05$), свидетельствуя об уменьшении тонуса коронарных сосудов и увеличении их перфузии. В присутствии ДМПс дофамин, увеличивающий сердечную производительность и коронарный кровоток, приводит к снижению ДП на 10,6% и достоверному в сравнении с контролем

увеличению ЧСС на 24,2 % ($p \leq 0,05$). Приведенные в таблице 2 показатели (ДМПс+ДА) получены на фоне 10-минутного ингибирующего воздействия ДМПс, учитывая которое можно говорить о сохранении общей динамики реактивности сердца на действие ДА. Графически данные, иллюстрирующие динамику ЧСС при действии ДА и ДМПс, приведены на рисунке 1.

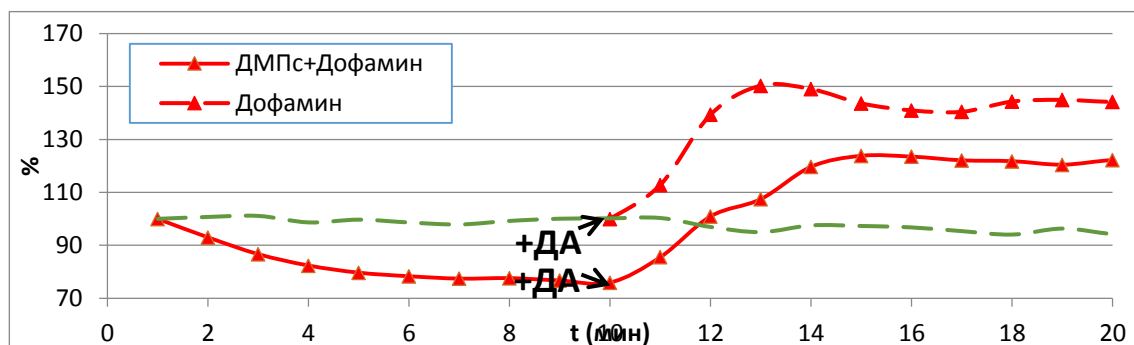


Рис. 1. – Динамика ЧСС под действием ДМПс и ДА, % от фоновых значений.

Снижение ЧСС и ИСФ в контроле обусловлено деградацией изолированного сердца. Нормой для данной экспериментальной модели считается деградация до 10 % в час. Серотонин в изучаемой концентрации 1×10^{-6} М снижает ДП до 53,1% от фона ($p \leq 0,05$), вызывая вазодилатацию коронарного русла (табл. 3).

Таблица 3 – Влияние серотонина (5НТ) на изолированное сердце крысы в присутствии ДМПс, % от фоновых значений (n=10, M±SE)

Перфузат	ДП	Int (1м)	ЧСС	ПД	ИСФ	КДД
Контроль	99,8± 1,8	94,5± 2,9	91,6± 3,4*	101,5± 3,4	92,8± 3,0*	107,1± 9,2
ДМПс 10^{-4} М	109,6± 2,6*#	69,7± 2,4*#^	67,6± 3,9*#	93,7± 3,8^	62,5± 2,7*#	110,7± 8,6^
ДМПс 10^{-4} М + 5НТ 10^{-6} М	110,3± 4,4#	56,9± 3,1*#	74,3± 2,0*#	72,7± 5,0*#	54,1± 4,0*#	85,7± 6,5
5НТ 10^{-6} М	53,1± 4,2*#	100,9± 4,0	101,5± 2,7#	108,8± 5,3	110,0± 5,5#	99,6± 3,1

Примечание: * – статистически значимое отличие от фона при $p \leq 0,05$; # – статистически значимое отличие от контроля при $p \leq 0,05$; ^ – статистически значимое отличие от ДМПс+5НТ при $p \leq 0,05$. Время экспозиции в контроле, с ДМПс, ДМПс+5НТ – 30 минут. Отсечка данных в эксперименте с 5НТ сделана через 20 минут.

Также он стимулирует ЧСС и ИСФ: оба показателя выше, чем в контроле, на 9,9 % и 17,2 % соответственно ($p \leq 0,05$). В присутствии ДМПс вазодилатирующее действие серотонина полностью блокируется, при этом сохраняется некоторая тенденция к повышению ЧСС.

Однако если анализировать данные изменения ЧСС в динамике (рис. 2), то виден положительный хронотропный эффект серотонина, наиболее выраженный в первые десять минут после его введения в перфузат. Максимальное увеличение ЧСС на 13,8%, развиваемые на пятой минуте, к десятой начинают снижаться, а уже к двадцатой минуте достигают фоновых значений (табл. 3). На рисунке 2 также показано, что введение серотонина в перфузат в присутствии ДМПс на одиннадцатой минуте не приводит к какому-либо заметному увеличению ЧСС до конца эксперимента, что свидетельствует об отмене положительного хронотропного действия серотонина на фоне ДМПс.

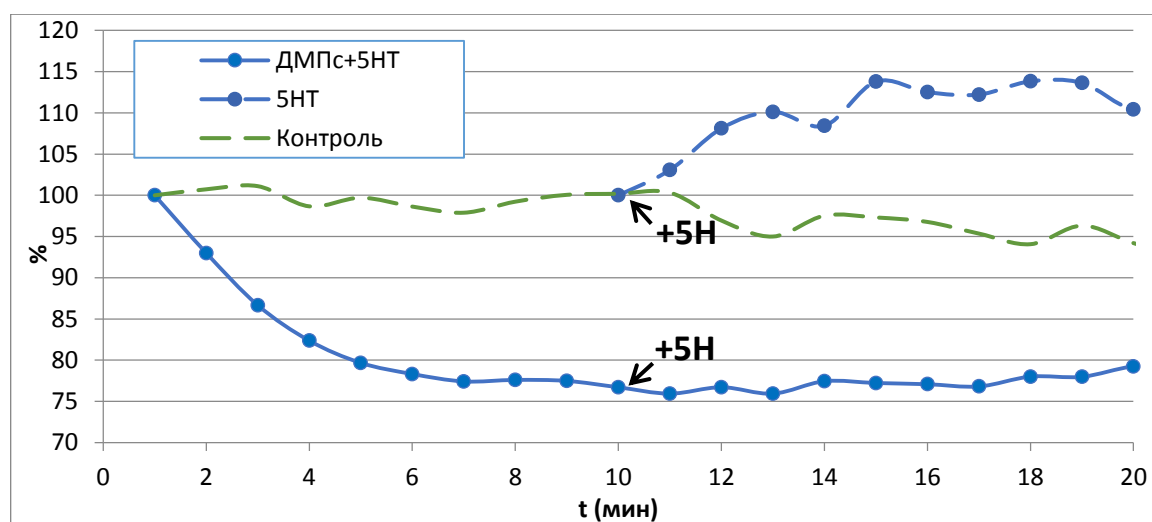


Рис. 2. – Динамика ЧСС под действием ДМПс и 5-НТ, % от фоновых значений.

Заключение. В результате проведенного исследования установлено, что вновь разработанный препарат ДМПс способен модулировать функциональную активность изолированного сердца крысы, уменьшая просвет коронарного русла и частоту сердечных сокращений. Механизм реализации вазоконстрикторного и отрицательного хронотропного эффекта ДМПс обусловлен блокадой серотониновых рецепторов коронарного русла (5НТ₁ и 5НТ₂) и правого предсердия (5НТ₄). Снижение возбудимости и проводимости атипичных кардиомиоцитов вследствие ингибирования кальциевого тока L-типа приводит к падению производительности миокарда под действием ДМПс. Установленные эффекты ДМПс могут свидетельствовать о наличии кардиопротекторного эффекта препарата вследствие уменьшения потребности миокарда в кислороде.

Обнаруженное противоаритмическое действие ДМПс способно нивелировать, либо вовсе предотвратить, неблагоприятные последствия от

увеличения продолжительности QT интервала, характерного для препаратов из группы бензамидов и, вероятно, позволит расширить область его применения.

Литература

1. Лаптев Д.С., Петунов С.Г., Бобков Д.В. и др. Влияние β -эндорфина на функциональную активность изолированного сердца крысы. Роль δ -опиоидных рецепторов // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2015. № 3(55). – С. 66–71.
2. Легеза В.И. Камынина М.Ф. Марковская И.В. и др. Влияние диметпрамида и метоклопрамида на скорость оборота катехоламинов в подкорково-стволовых структурах головного мозга крыс // Фармакология и токсикология. – 1986. № 49(4). – С. 25–27.
3. Минасян С.М., Галагудза М.М., Сонин Д.Л. и др. Методика перфузии изолированного сердца крысы // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2009. № 32(4). – С. 54–59.
4. Anvari K., Seilanian-Toussi M., Hosseinzad-Ashkiki H. et al. Comparison of 5-HT₃ Receptor Antagonist and Metoclopramide in the Patients Receiving Chemotherapeutic Regimens Including CMF, CAF and CHOP // Iran J Cancer Prev. – 2015. № 8(2). – P. 84–88.
5. Juan-Fita M.J., Vargas M.L., Hernández J. Diazepam enhances inotropic responses to dopamine in rat ventricular myocardium // Anesth Analg. – 2006. № 102(3). – P. 676–81.
6. Pau D., Workman A.J., Kane K.A. et al. Electrophysiological effects of 5-hydroxytryptamine on isolated human atrial myocytes, and the influence of chronic β -adrenoceptor blockade // British Journal of Pharmacology. – 2003. № 140. – P. 1434–1441.
7. Rumore M.M., Lee S.E., Wang S. et al. Metoclopramide-induced cardiac arrest // Clin Pract. – 2011. № 1(4). – P. 83.
8. Takano S., Hoshino Y., Li L., Matsuoka I. et al. Dual roles of 5-hydroxytryptamine in ischemia-reperfusion injury in isolated rat hearts // J Cardiovasc Pharmacol Ther. – 2004. № 9(1). – P. 43–50.

КОРРЕКЦИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОСТРОГО ТОКСИЧЕСКОГО ГЕПАТИТА ФЕТАЛЬНЫМИ СТВОЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ

Г.А. Протасова, Л.В. Шабашева, В.Б. Попов
ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия
gpech@fmbamail.ru

Введение. В связи с высокими темпами развития химической и фармацевтической промышленности, а также внедрением их продукции во все сферы жизни человека, проблема заболеваний печени токсического генеза приобретает все большую актуальность. Промышленные

токсиканты являются в настоящее время самыми распространенными факторами токсических поражений печени у людей. Гепатотоксины при воздействии на печень повреждают ее паренхиму, нарушают обменные и ферментативные процессы, вызывая различные патологические состояния – от жировой и белковой дистрофии до токсического гепатита, цирроза и карциномы.

Острая печеночная недостаточность (ОПН) встречается не так часто, как хронические формы заболевания, но представляет значительную опасность для больных прогрессированием патологических процессов, выраженностью проявлений патологических изменений и непредсказуемостью исхода заболевания. Единственно эффективным методом лечения таких патологий является трансплантация печени. Однако существующий дефицит донорских органов, высокая стоимость трансплантации и быстрое течение патологических процессов при ОПН не позволяют больным с печеночной патологией получить своевременно необходимую для них помощь.

Альтернативой трансплантации печени могут стать новые разрабатываемые перспективные методы лечения заболеваний печени, основанные на использовании стволовых клеток, в том числе фетальных стволовых клеток.

Настоящая работа направлена на оценку эффективности коррекции острого токсического гепатита, индуцированного четыреххлористым углеродом, клетками с фетальной печени (КФП) и изучение их роли в обеспечении регенераторных процессов в печени.

Материалы и методы исследования. Работа проведена на половозрелых аутбредных СПФ самках крыс (Wistar), полученных из питомника «Пушино» (г. Пушино, Московская область). Содержание и кормление лабораторных животных производилось в соответствии с Правилами лабораторной практики в Российской Федерации, утвержденными приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 19.06.2003 № 267. Проведены эксперименты по моделированию острого токсического повреждения печени, отработаны способы выделения и оценки миграции в печень КФП, инъецированных в хвостовую вену животных, проведена оценка эффективности коррекции острого токсического гепатита.

Сформировано четыре группы животных (по 6 животных в группе):

- группа контроля (интактные животные);
- группа позитивного контроля (животным в/ж вводили CCl_4 в дозе 3000 мг/кг);
- группа животных с инъекцией КФП (интактным животным трансплантировали КФП в количестве 5 миллионов, в объеме 100 мкл);
- группа животных с инъекцией КФП (однократное в/ж введение CCl_4 в дозе 3000 мг/кг + однократное в/в введение суспензии КФП в количестве 5 миллионов, в объеме 100 мкл).

Для моделирования острого токсического повреждения печени крысам однократно внутривенно вводили CCl_4 в масляном растворе, в дозе 3000 мг/кг. Животных через 1, 3, 5, 7, 16 суток после воздействия подвергали эвтаназии с помощью эфира.

В качестве контроля использовали интактных животных. Для патоморфологического анализа у животных иссекали печень, которую фиксировали в 10 %-ном формалине, проводку осуществляли в гистологическом процессоре замкнутого цикла Tissue-Tek VIP (Sakura Япония), заливку в парафин проводили на станции парафиновой заливки Tissue - Tek TEC (Sakura Япония), срезы толщиной 4 мкм изготавливали на ротационном микротоме Accu - Cut SRM 200 (Sakura Япония). Гистологические срезы окрашивали гематоксилин - эозином, азур - эозином, на коллаген по Ван-Гизону. В работе использовались патоморфологические и иммунофлуоресцентные методы анализа.

Нарушение углеводного обмена у подопытных крыс оценивали по уровню содержания гликогена в паренхиме печени, применяли гистохимический метод выявления содержания полисахаридов в срезах печени по Шабадашу [2].

Для обнаружения жировых включений фиксированную в формалине печень замораживали и изготавливали срезы толщиной 8 мкм с использованием криостата "Tissue-Tek Cryo3 (Sakura Япония) и окрашивали суданом 3, с последующим заключением срезов в поливиниловый спирт. Выявление содержания железа в клетках печени (ферритина и гемосидерина) проводили, используя гистохимическую реакцию на берлинскую лазурь (методом Перлса) [2].

Для доказательства миграции КФП из вены в ткань печени проводили эксперименты с их трансплантацией в хвостовую вену интактным животным. Через 7 дней после инъекции проводили эвтаназию, забор ткани печени и последующие патоморфологический и иммунофлуоресцентный анализы. Для коррекции острого токсического повреждения печени через 6 часов после введения CCl_4 подопытным животным в хвостовую вену вводили КФП в количестве 5 миллионов, в объеме 100 мкл. Клеточную суспензию печени получали из эмбрионов крысы линии Вистар. Ткани печени были выделены из эмбрионов крысы 19 ДР согласно стандартным протоколам [5, 6] с модификациями.

Общее число клеток и число жизнеспособных клеток подсчитывали в автоматическом счетчике клеток Countess Automated Cell Counter (Invitrogen, США). КФП окрашивали флуорохромом PKH26 и использовали для трансплантации в хвостовую вену подопытным животным. Детекцию свечения меченных PKH26 клеток осуществляли при длине волны 567 нм.

Иммунофлуоресцентное окрашивание КФП крыс 19ДР и криосрезов печени подопытных крыс. Для иммунофлуоресцентного окрашивания в качестве первичных антител использовали: Oval Cell Marker (OV-6) mouse

monoclonal (Santa Cruz Biotechnology, INC) – маркер овальных клеток, Anti-AFP, antibody produced in rabbit (Sigma-Aldrich) – маркер фетальных гепатобластов и показатель их секреторной активности (АФП - основной белок эмбриональной сыворотки крови млекопитающих), Rabbit monoclonal AB to Cytokeratin 19 (Abcam Inc.) – специфическому поверхностному маркеру билиарных и стволовых печеночных клеток, и Mouse monoclonal antibody – CD 45 (EMD Millipore Corporation) – основной маркер гемопоэтических стволовых клеток.

В качестве вторичных антител использовали мышинные антитела, конъюгированные с флуорохромом Alexa Fluor 568 (orange/gold) «goat anti-mouse IgG1(y1)» (StemCell Technologies) и кроличьи антитела конъюгированные с флуорохромом Alexa Fluor 568 (orange/gold) «goat anti-rabbit IgG(H+L)» (StemCell Technologies). Для иммунофлуоресцентного анализа (ИФА) приготавливали препараты из диссоциированных КФП и криосрезов печени подопытных крыс согласно протоколу [6].

Полученные препараты анализировали с помощью флуоресцентного полуавтоматического микроскопа «Olympus BX61» (Olympus, Япония) оснащенного программой CytoVision (Genetix, Великобритания), с фильтром возбуждения ВР (586 нм), при увеличении от х 100 до х 1000.

Результаты исследований. Фенотипическая характеристика суспензии клеток фетальной печени крысы. Проведен иммунофлуоресцентный анализ мазков КФП крысы 19 ДР, в результате чего была выявлена экспрессия основных маркеров печеночных стволовых клеток – OV 6 маркер овальных клеток (рис. 1 А), альфа-фетопротеина – маркер фетальных гепатобластов и показатель их секреторной активности (основной белок эмбриональной сыворотки крови млекопитающих) [1] (рис. 1 В), цитокератина 19 – специфический поверхностный маркер билиарных и стволовых печеночных клеток, (рис. 1 С) и основной маркер гемопоэтических стволовых клеток – CD 45 (рис. 1 D).

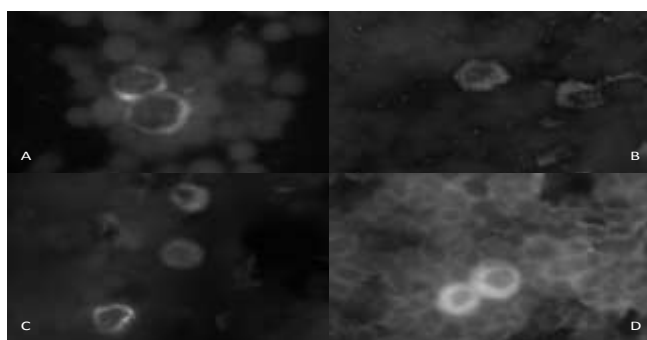


Рис. 1. А – Овальные клетки в мазке суспензии КФП 19ДР, Окраска антителами к поверхностному маркеру овальных клеток OV6., ув. х100; В – Окраска антителами к альфа-фетопротеину, ув. х 40; С – Окраска антителами к цитокератину 19, ув. х40; D – Окраска антителами к CD 45, ув. х100. Контраст (ядер клеток) DAPI.

Таким образом, суспензия клеток, полученная из печени эмбриона крысы 19 ДР, была охарактеризована с помощью ИФА. Выявлена экспрессия основных маркеров печеночных стволовых клеток – OV6, альфа-фетопротеина, цитокератина 19 и основного маркера гемопоэтических стволовых клеток – CD 45. Полученная суспензия клеток в дальнейшем была использована для коррекции токсического поражения печени.

Эксперименты по выявлению КФП, мигрирующих из хвостовой вены в ткань печени

На гистологических срезах печени эмбриона крысы 19 ДР после окраски гематоксилин-эозином выявлено значительное количество гепатобластов, гепатоцитов, холангиоцитов в меньшей степени встречались эритробласты и мегакариоциты.

Патоморфологический анализ гистологических срезов печени, через 7 дней после введения КФП интактным животным, показал наличие в синусоидах гемопоэтических стволовых клеток (эритробластов, мегакариоцитов), а иммунофлуоресцентный анализ свежемороженых срезов печени выявил экспрессию основных маркеров печеночных стволовых клеток – OV6 и AFP с локализацией в перипортальных зонах, и CD 45 (общий лейкоцитарный антиген, присутствующий на поверхности всех представителей кроветворных рядов, кроме зрелых эритроцитов), с локализацией в синусоидах.

Таким образом, присутствие в паренхиме печени интактных животных клеток фетальной печени, через 7 дней после введения подтверждено иммунофлуоресцентным и патоморфологическим методами исследования.

Коррекция острого токсического повреждения печени клетками фетальной печени крысы и оценка их роли в обеспечении регенераторных процессов в печени

При трансплантации клеток фетальной печени в хвостовую вену через 6 часов после однократного внутрижелудочного введения CCl₄ в дозе 3000 мг/кг наблюдалось уменьшение числа погибших животных в 2,5 раза по отношению к группе позитивного контроля (ПК) и составляло 11% при инъекции КФП и 27% в группе ПК.

КФП перед трансплантацией предварительно окрашивали витальной флуоресцентной меткой РКН 26, их присутствие и локализацию определяли на свежемороженых срезах печени с помощью флуоресцентного микроскопа. ИФА свежемороженых срезов печени подопытных животных после трансплантации КФП выявил уже через 1 сутки единичные РКН⁺ клетки, находящиеся в синусоидах печени.

В дальнейшие сроки – с 3 по 7 сутки наблюдалось увеличение числа РКН позитивных клеток, а к 16 суткам отмечались клетки, которые казались уже встроенными в ткань печени (в область печеночных балок).

Патоморфологический анализ гистологических препаратов печени,

окрашенных азур-эозином, через 1 сутки после воздействия CCl_4 выявил выраженные центролобулярные некрозы паренхимы с нарушением трабекулярного строения центральных зон, гидропическую, белковую, углеводную и жировую дистрофии, периваскулярные отеки. Интенсивность перечисленных патологических процессов в паренхиме и строме печени через 1 сутки не изменилась после трансплантации КФП, отмечалось лишь немногочисленное скопление овальных клеток (прогениторные стволовые клетки печени), мигрирующих в область поражения – центральную зону печени (рис. 2).

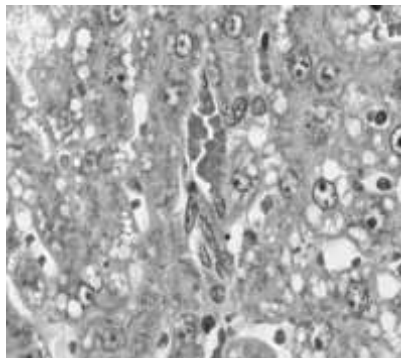


Рис. 2. – Печень, 1 сутки, трансплантация КФП, гиперплазия овальных клеток в центральной зоне. Окраска азур-эозином, ув. $\times 100$.

Патоморфологические изменения через 3 суток после воздействия CCl_4 в группе позитивного контроля проявлялись участками кровоизлияний в зонах некроза, нарушением трабекулярного строения центральных зон печени, клеточной инфильтрацией, атипичными митозами гепатоцитов, дистрофические изменения паренхимы сохранялись на прежнем уровне.

Введение КФП способствовало снижению интенсивности некротических и дистрофических процессов в паренхиме к 3 суткам, у некоторых животных происходило восстановление трабекулярного строения центральных зон печени (рис. 3 А, В).

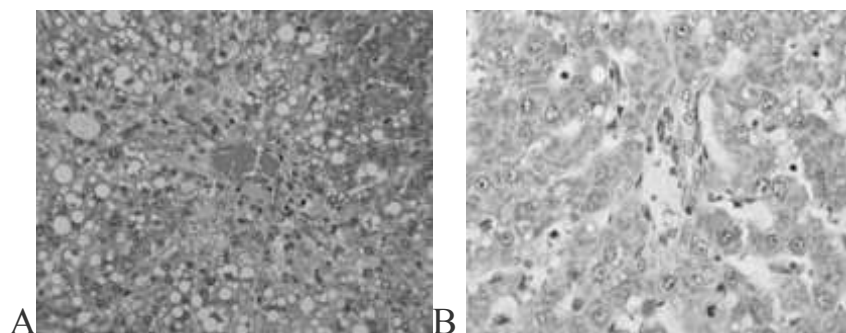


Рис. 3. – Печень, 3 сутки. А – группа ПК, нарушение строения трабекул, дистрофические изменения. ув. 40. В – трансплантация КФП, восстановление трабекулярного строения в центральных зонах, снижение интенсивности дистрофических процессов, ув. 65: окраска азур-эозином.

К 3 – 5 суткам после введения КФП наблюдалось увеличение числа овальных клеток в центральных зонах печени, что подтверждено иммунофлуоресцентным анализом свежемороженых срезов печени, окрашенных на поверхностный маркер овальных клеток OV6.

При обширных поражениях печени часть овальных клеток способна дифференцироваться в гепатоциты, другая часть развивается по холангиоцитарной линии дифференцировки и формирует систему разветвленных протоков, организованных по типу желчного эпителия [4] и участвуют в образовании холангиол *de novo*, способствуя восстановлению функции печени, что и наблюдалось на 5 сутки после трансплантации КФП и подтверждалось экспрессией специфического поверхностного маркера билиарных клеток - цитокератина 19.

На 5 – 7 сутки деструктивные изменения паренхимы после воздействия CCl_4 в группе позитивного контроля уменьшались: снижалась интенсивность дистрофических процессов, происходило восстановление трабекулярного строения центральных зон, отмечалось усиление макрофагальной реакции в зонах поражения, однако на этот срок наблюдались выраженные сосудистые повреждения в виде панваскулитов.

Трансплантации КФП устраняли сосудистые нарушения, в паренхиме наблюдались остаточные явления жировой дистрофии, но менее выраженные, чем в группе ПК, число овальных клеток в этот срок было максимальным за весь период исследования, чего не наблюдалось в группе позитивного контроля; это явилось свидетельством их активной пролиферации и участия в процессах регенерации.

Дополнительным свидетельством сказанного является присутствие OV6 позитивных клеток в свежемороженых срезах печени, секретирующих АФП (эмбриональный белок).

К 16 суткам после воздействия CCl_4 в паренхиме печени отмечалась жировая дистрофия, после коррекции КФП у части подопытных животных наблюдалось полное восстановление строения паренхимы и стромы печени, как представлено на рисунке 4 А, В.

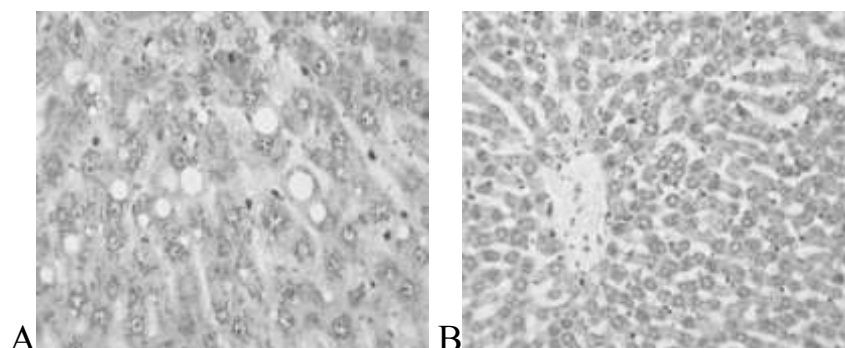


Рис. 4. – Печень, 16 сутки. А – группа ПК. Вакуолизация цитоплазмы гепатоцитов, ув. 65. В – трансплантация КФП, нормализация структур паренхимы и стромы, ув. 40; окраска азур-эозином.

Оценка углеводного обмена по уровню содержания гликогена в цитоплазме гепатоцитов (гистохимическая реакция по Шабдашу)

Содержание гликогена в цитоплазме гепатоцитов после воздействия CCl_4 характеризовалось волнообразным течением, а именно резким уменьшением гликогена через сутки, практически полным исчезновением гликогена на 3 сутки, нормализацией его содержания к 5–7 сутками и вновь резким снижением содержания гликогена на 16 сутки.

Трансплантация КФП не повлияла на содержание гликогена на 1 сутки эксперимента. Через 3 суток после введения клеток происходило восстановление содержания гликогена в цитоплазме гепатоцитов, та же картина наблюдалась и на 16 сутки после трансплантации КФП (рис. 5).

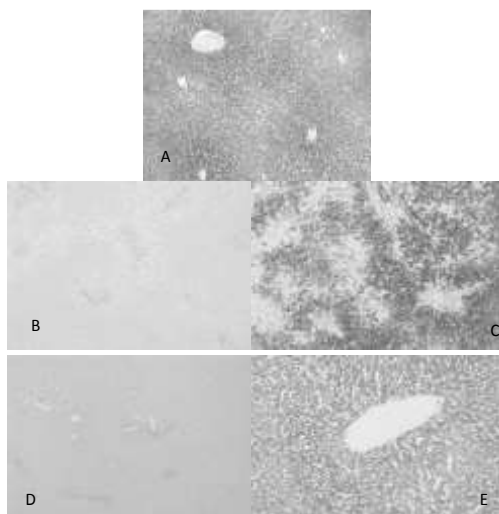


Рис. 5. – Печень, гистохимическая окраска на гликоген по Шабдашу. А – контроль, нормальное распределения гликогена по долькам печени. В – 3 сутки, группа ПК, отсутствие гликогена; С – 3 сутки, после трансплантации КФП наличие гликогена; D – 16 сутки, группа ПК, выраженное снижение гликогена; E – 16 сутки, трансплантация КФП, нормализация содержания гликогена, ув. $\times 10$.

Заключение. Настоящее исследование направлено на отработку экспериментальной модели острого токсического поражения печени взрослых животных, с последующей его коррекцией КФП.

В результате проведенных экспериментов в качестве модели был выбран четыреххлористый углерод в дозе 3000 мг/кг, вызывающий выраженные стойкие изменения в паренхиме и строме печени. Введение CCl_4 в дозе 3000 мг/кг приводило к выраженным центрлобулярным некрозам паренхимы, гидropической, белковой, углеводной и жировой дистрофиям, периваскулярным отекам, панваскулитам.

Дистрофические изменения сохранялись до 16 суток. Трансплантация в хвостовую вену КФП способствовала снижению интенсивности некротических и дистрофических процессов в паренхиме, устранению сосудистых нарушений, что может быть обусловлено способностью КФП к репарации, как стромы, так и паренхимы, за счет

имеющихся в ней различных типов стволовых клеток – печеночных стволовых клеток, кроветворных клеток и клеток со смешанными свойствами, находящихся в состоянии эпителио-мезенхимной трансформации [3].

Полученные результаты свидетельствуют об эффективности КФП при коррекции поражений печени гепатотропными ядами (CCl₄) и могут служить экспериментальным обоснованием возможности использования клеток фетальной печени при лечении острых токсических гепатитов.

Литература

1. Андреева Д.И., Газизов И.М., Калигин М.С., Киясов А.П. Участие трансфицированных мононуклеаров пуповинной крови человека в регенерации печени крыс / Актуальные вопросы клеточных технологий: матер. III Межд. симп. // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2010. – Т. 5, № 3. – С. 14-15.
2. Меркулов Г.А. Курс патологогистологической техники. – Л.: Медицина, 1969. – 423 с.
3. Паюшина О.В., Домарацкая Е.И., Старостин В.И. Клеточный состав и регуляторные функции стромы зародышевой печени // Цитология. – 2012. – Т. 54, № 5. – С. 369-380.
4. Фактор В.М., Энгельгардт Н.В., Язова А.К. и др. Общие антигены овальных клеток и холангиоцитов мыши: выявление с помощью моноклональных антител // Онтогенез. – 1990. – Т. 21. – С. 625-632.
5. Freshney R.I., Culture of Animal Cells // A manual of Basic Techniques. – N. Y., – 1995. – V.39. – P. 184-185.
6. McGrath K., Koninski A., Malik J. et al. Circulation is established in a stepwise pattern in the mammalian embryo // Blood. – 2003. – V.101. – P. 1669-1672.

ИЗМЕНЕНИЕ ДОЛЕВОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ ПОСЛЕ ВНУТРИЖЕЛУДОЧНОГО ВВЕДЕНИЯ ЭТАНОЛА

А.С. Пушкин, Н.В. Образцов, Е.Д. Другова, С.А. Камшилин,
С.И. Дворецкая, О.В. Полехина, А.В. Борунов

ФГУП «ГосНИИОХТ», Москва

dir@gosniiocht.ru

Введение. Система крови наиболее чувствительна к воздействиям физиологически активных веществ [1]. В данной работе, ориентированной на гематологическое выявление такого воздействия, был выбран этанол. Это вещество применяется в качестве антидота при отравлении метанолом и этиленгликолем. В предыдущих исследованиях было доказано, что морфоденситометрический анализ крови [2] может быть применен для экспертизы отравлений и при мониторинге здоровья лиц, проживающих в неблагоприятных экологических районах или занятых на предприятиях с

вредными условиями труда [3-4].

В ходе выполнения исследования предполагалось, что изменение долевого распределения клеток периферической крови будет служить маркером воздействия этанола. Кроме того, в условиях эксперимента целесообразна оценка его наркотического действия.

Цель исследований: Изучить влияние внутрижелудочного введения этанола на изменение долевого распределения клеток периферической крови крыс. и поведенческие реакции.

Материалы и методы. Исследование проведено на трех группах крыс (по четыре животных в каждой группе с массой тела 180–200 г): интактных, контрольных и экспериментальных животных.

Раствор этанола вводили крысам внутрижелудочно с помощью зондов в объеме 5 мл/кг (20%-ного раствора), ежедневно, в течение трех суток (опытная группа). Дистиллированную воду в объеме 0,2 мл вводили внутрижелудочно (контрольная группа) однократно. 3 группу составили интактные животные (фон).

В течение всего срока эксперимента наблюдали за поведением животных. После введения этанола в течение трёх дней были исследованы поведенческие реакции крыс при помощи трёх методик: стеклянный сосуд (количество стоек и грумминг); открытое поле (количество заглядываний в лунки и за край поля, грумминг); горячая пластина (количество секунд, которое прошло после посадки животного на пластину, нагретую до +54°C, и отдёргивание лап от пластины или их облизывание).

Пробы крови в объеме 6 мкл собирали из хвостовой вены при помощи автоматической пипетки до введения этанола и воды, через 1 и 7 сут после первого введения. Мазки крови готовили при помощи устройства V-Sampler и окрашивали красителями Романовского и Май-Грюнвальда на автоматическом мультитейнере фирмы Leica.

Исследование долевого распределения клеток периферической крови проводили с использованием автоматизированного аппаратно-программного комплекса «Мекос-Ц2». Полученные данные анализировали методами прикладной статистики. Сравнение результатов проводили при помощи критерия Даннета.

Результаты и обсуждение. Изменение долевого распределения клеток периферической крови крыс при внутрижелудочном введении этанола и воды приведено в табл. 1-4.

Как следует из данных, представленных в таблицах 1 и 2, через сутки и 7 суток после введения этанола достоверных отличий от фона и контроля не было выявлено. Однако наблюдалась следующая тенденция: через 7 суток у животных, получивших этанол, снижалась доля эхиноцитов и сфероцитов, увеличивалась доля деформированных эритроцитов, по сравнению с животными, получившими дистиллированную воду однократно.

Таблица 1 – Долевое распределение эритроцитов разных типов у животных через сутки после первого в/ж введении воды (контроль) и этанола по сравнению с фоновыми значениями

Тип клеток	Фон	Контроль	Этанол
Дискоциты	0,932±0,012	0,943±0,014	0,924±0,080
Деформированные	0,013±0,009	0,016±0,006	0,014±0,015
Эхиноциты	0,001±0,0	0,006±0,005	0,081±0,0
Стоматоциты	0,004±0,004	0,004±0,002	0,002±0,001
Элиптоидные	0,014±0,004	0,013±0,004	0,007±0,004
Каплевидные	0,006±0,003	0,004±0,004	0,002±0,001
Мишеневидные	0,025±0,018	0,009±0,007	0,001±0,001
Укушенные	0,009±0,003	0,003±0,001	0,006±0,004
Сфероциты	0,004±0,003	0,010±0,009	0,021±0,021

Таблица 2 – Долевое распределение эритроцитов разных типов на 7 сутки у животных после в/ж введении воды (контроль) и этанола по сравнению с фоновыми значениями

Тип клеток	Фон	Контроль	Этанол
Дискоциты	0,952±0,015	0,924±0,042	0,928±0,074
Деформированные	0,024±0,014	0,023±0,011	0,054±0,077
Эхиноциты	0,002±0,001	0,005±0,003	0,003±0,004
Стоматоциты	0,002±0,001	0,004±0,005	0,003±0,0
Элиптоидные	0,012±0,002	0,015±0,011	0,006±0,003
Каплевидные	0,002±0,0	0,004±0,003	0,004±0,002
Мишеневидные	0,002±0,0	-	0,002±0,0
Укушенные	0,001±0,001	0,004±0,002	0,004±0,003
Сфероциты	0,010±0,000	0,05±0,0	0,009±0,010

Таблица 3 – Долевое распределение лейкоцитов разных типов у животных через сутки после первого в/ж введении воды (контроль) и этанола по сравнению с фоновыми значениями

Тип клеток	Фон	Контроль	Этанол
Нормальные палочкоядерные лейкоциты	0,025±0,025	0,030±0,044	0,012±0,006
Аномальные палочкоядерные лейкоциты	0,007±0,006	0,010±0,014	0,010±0,010
Нормальные сегментоядерные лейкоциты	0,037±0,042	0,029±0,006	0,028±0,007

Таблица 3. Продолжение

Аномальные сегментоядерные лейкоциты	0,009±0,006	0,017±0,009	0,014±0,007
Нормальные эозинофилы	0,009±0,000	0,008±0,007	0,005±0,001
Аномальные эузинофилы	-	0,003±0,000	0,003±0,001
Нормальные малые лимфоциты	0,139±0,052	0,131±0,026	0,192±0,064
Аномальные малые лимфоциты	0,017±0,012	0,020±0,007	0,013±0,007
Нормальные средние лимфоциты	0,286±0,071	0,253±0,066	0,323±0,082
Аномальные средние лимфоциты	0,029±0,010	0,039±0,012	0,036±0,012
Нормальные большие лимфоциты	0,197±0,028	0,174±0,054	0,178±0,097
Аномальные большие лимфоциты	0,034±0,006	0,047±0,007	0,028±0,027
Нормальные моноциты	0,037±0,005	0,061±0,016	0,038±0,024
Аномальные моноциты	0,017±0,008	0,037±0,032	0,016±0,005
Нормальные плазмоциты	0,005±0,004	0,026±0,018	0,012±0,008
Аномальные плазмоциты	0,005±0,0	0,017±0,024	0,003±0,001
Остаточные тела	0,158±0,205	0,103±0,026	0,096±0,045

Таблица 4 – Долевое распределение лейкоцитов разных типов на 7 сутки у животных после в/ж введении воды (контроль) и этанола по сравнению с фоновыми значениями

Тип клеток	Фон	Контроль	Этанол
Нормальные палочкоядерные лейкоциты	0,025±0,022	0,021±0,018	0,021±0,017
Аномальные палочкоядерные лейкоциты	0,007±0,006	0,006±0,003	0,008±0,001

Таблица 4. Продолжение

Нормальные сегментоядерные лейкоциты	0,052±0,039	0,080±0,058	0,072±0,062
Аномальные сегментоядерные лейкоциты	0,019±0,020	0,017±0,014	0,015±0,010
Нормальные эозинофилы	0,009±0,006	0,004±0,003	0,004±0,0
Аномальные эозинофилы	0,004±0,001	0,002±0,0	-
Нормальные малые лимфоциты	0,134±0,063	0,171±0,034	0,190±0,107
Аномальные малые лимфоциты	0,021±0,016	0,014±0,013	0,036±0,030
Нормальные средние лимфоциты	0,279±0,072	0,345±0,020	0,327±0,096
Аномальные средние лимфоциты	0,036±0,024	0,030±0,004	0,062±0,039
Нормальные большие лимфоциты	0,232±0,025	0,154±0,011*	0,119±0,026*
Аномальные большие лимфоциты	0,039±0,006	0,014±0,004*	0,043±0,046
Нормальные моноциты	0,035±0,016	0,016±0,007	0,021±0,016
Аномальные моноциты	0,015±0,006	0,009±0,003	0,010±0,004
Нормальные плазмоциты	0,006±0,003	0,005±0,003	0,007±0,004
Аномальные плазмоциты	0,004±0,003	0,005±0,004	0,003±0,001
Остаточные тела	0,104±0,064	0,112±0,089	0,067±0,056

* - $p \leq 0,05$ по сравнению с крысами фоновой группы

Как следует из данных, приведенных в таблицах 3 и 4, через 1 сутки после в/ж введения белым крысам этанола и дистиллированной воды у животных достоверных отличий от фона и друг от друга не найдено. Через 7 суток по сравнению с фоном в группе с дистиллированной водой статистически значимо снижаются доли больших нормальных и аномальных лимфоцитов; в группе этанола уменьшается доля нормальных больших лимфоцитов.

Были отмечены следующие тренды (по сравнению с фоном):

- через 1 сутки снижалась доля нормальных палочкоядерных лейкоцитов в группе животных, получавших этанол;
- через 7 суток снижалась доля нормальных палочкоядерных

лейкоцитов в опытной и контрольной группах (с этанолом и водой соответственно);

- через сутки в группах с этанолом и водой доля нормальных сегментоядерных лейкоцитов уменьшалась, а через 7 суток – увеличивалась;

- доля нормальных малых и средних лимфоцитов повышалась через сутки после воздействия этанола, а доля аномальных средних – через 1 сутки в контрольной и опытной группах.

- на 7 сутки эксперимента доля малых и средних нормальных лимфоцитов увеличилась в группах с этанолом и водой, также повысилась доля аномальных средних в группе с этанолом.

Результаты изучения влияния этанола и дистиллированной воды на поведенческую активность крыс приведены в таблицах 5-6.

Таблица 5 – Сравнение поведенческих реакций у крыс двух групп на первый день эксперимента

Группы	Стеклоанный сосуд		Открытое поле			Горячая пластина
	Стойки	Грумминг	Заглядывание		Грумминг	
			в лунки	за край поля		
Интakтные животные (4)	7,80±	1,4±	5,00±	6,60±	0,60±	9,40±
	2,86	0,55	2,12	1,34	0,55	1,14
Контроль (4)	7,50±	2,75±	6,00±	4,50±	1,00±	8,25±
	1,29	1,71	1,16	1,73	0,81	2,06
Этанол (22)	7,25±	1,23±	5,14±	2,95±	0,68±	9,59±
	3,31	1,11*	3,08	2,54●	0,84	2,36

*- $p \leq 0,05$ здесь и далее по сравнению с крысами контрольной группы (дистиллированная вода);

● - $p \leq 0,05$ здесь и далее по сравнению с крысами интактной группы.

Как свидетельствуют результаты эксперимента, приведенные в табл. 5, в первый день у крыс через час после внутрижелудочного введения 20°этанола наблюдалось статистически значимое снижение грумминга (стеклянный сосуд) по сравнению с животными из контрольной группы.

Выявлено значимое уменьшение количества заглядываний за край у животных экспериментальной группы при сопоставлении с интактными крысами. Отмечена тенденция к снижению количества заглядываний в лунки по сравнению с контрольными крысами.

Как следует из данных, приведенных в табл. 6, на второй день внутрижелудочного введения 20° этанола зарегистрировано достоверное снижение количества стоек в стеклянном сосуде при сопоставлении с контрольной группой. Не отмечено статистически значимых изменений в поведенческих реакциях на третий день эксперимента.

Таблица 6 – Сравнение поведенческих реакций у крыс двух групп на второй день эксперимента

Группы	Стеклоанный сосуд		Открытое поле			Горячая пластина
	Стойки	Грумминг	Заглядывание		Грумминг	
			в лунки	за край поля		
Контроль (4)	3,75± 1,26	1,50± 1,00	3,75± 2,63	1,75±1 ,5	0,50± 0,56	7,50± 2,38
Этанол (22)	1,81± 1,75*	0,90± 0,91	4,35± 3,69	1,30± 1,84	0,5± 0,69	9,85± 3,56

Таким образом, полученные данные показывают, что при экспериментальной оценке воздействия этанола в качестве биомаркеров целесообразно использовать такие показатели распределения доли лейкоцитов, как нормальные большие и аномальные лимфоциты и поведенческие реакции, свидетельствующие соответственно о нарушении лимфоморфогенеза и снижении ориентировочно-исследовательских реакций, характерных для веществ наркотического типа действия.

Выводы:

1. Внутрижелудочное введение воды крысам не привело к статистически значимым отличиям от интактных животных в долевого распределении клеток периферической крови, кроме уменьшения доли нормальных больших и аномальных лимфоцитов на 7 сутки эксперимента. На 1 сутки эксперимента отмечена тенденция снижения доли нормальных больших лимфоцитов и повышение доли аномальных лимфоцитов.

2. Этанол в исследуемой дозе и способе введения не приводил к статистически значимым изменениям долевого распределения клеток периферической крови крыс, кроме уменьшения доли нормальных больших лимфоцитов на 7 сутки воздействия.

3. Этанол в условиях эксперимента по сравнению с фоновыми и контрольными данными вызывал статистически значимые изменения ряда поведенческих реакций в течение двух суток после его введения (грумминга, числа заглядываний в лунки и за край поля; количества стоек).

Литература

1. Tihonov M.N., Cygan V.N. Obshhie mehanizmy toksichnosti metallov URL: <http://www.proatom.ru/modules.php?name=News&file=article&sid=2391> (дата обращения: 12.05.2014).
2. Плясунова С.А., Балугян Р.Ш., Хмельницкий К.Е., Медовый В.С., Парпара А.А., Пятницкий А.М., Соколинский Б.З., Демьянов В.Л., Николаенко Д.С. (РДКБ, 23 ГКБ, ИДТХ, МЕКОС). Автоматизированные методики микроскопических анализов мазков крови - медицинские испытания комплекса МЕКОС-Ц2. Методы микроскопического анализа.

М., 2009. – С. 53-75.

3. Шульга В.Я., Образцов Н.В., Полехина О.В., Пушкин А.С., Комлев А.И., Швецова-Шиловская Т.Н., Кондратьев В.Б. Методология распознавания поражений химическими веществами в низких дозах. – 3-й съезд токсикологов России. Тезисы докладов / М-во здравоохранения и соц. Развития Российской Федерации [и др.]. – М., 2008. – С. 467-468.

4. Пушкин А.С., Образцов Н.В., Другова Е.Д., Камшилин С.А., Дворецкая С.И., Полехина О.В. Индикация и идентификация контакта лабораторных животных с ксенобиотиками по изменениям морфометрических характеристик клеток периферической крови. // Химия и технология органических веществ». – 2017. – № 1. – С. 62-68.

ТОКСИКОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА МОНОТОПЛИВА «ЗТ» НА ОСНОВЕ НИТРАТА ГИДРОКСИЛАММОНИЯ

А.С.Радилов¹, С.А. Дулов¹, Н.В.Ерунова¹, Ю.И. Карташов², И.И. Новиков², В.Б. Франчук², К.В. Первушина², А.М. Маслюк²

¹ ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия
grech@fmbamail.ru

² ФГУП «РНЦ «Прикладная химия», Санкт-Петербург, Россия
vika.antipina@mail.ru; peno_oguin@mail.ru

Введение. В качестве штатного однокомпонентного топлива для вспомогательных двигательных установок космических аппаратов используется гидразин. Это обусловлено относительно благоприятным сочетанием энергетических, физико-химических и эксплуатационных характеристик гидразина. Однако гидразин является высокотоксичным веществом и относится к первому классу опасности.

С середины 90-х годов в США, Западной Европе (Франции, Швеции, Нидерландах, Германии и др.), Японии, Китае осуществляется поиск и разработка жидких однокомпонентных топлив на основе твердых высокоэнергетических веществ, которые ранее отрабатывались в различных областях оборонной техники. Для компоновки монотоплив используются водорастворимые горючие из классов аминов, гидразинов и их солей, спиртов, аминокислот, солей имидазола, а также ряда других [8-12]. К их числу относится нитрат гидроксиламмония ($[\text{NH}_3\text{OH}]^+[\text{NO}_3]^-$), (НГА).

НГА относится к классу гидроксиламинов, который являются основной составляющей в классе жидких однокомпонентных топлив, широко используется в ракетной и атомной промышленности, представляет интерес для улучшения экологических характеристик ракетного монотоплива [14].

Достоинством разрабатываемого монотоплива «ЗТ» по сравнению с гидразином помимо его низкой токсичности является высокая энергетика (в 1,2 раза) и плотность (в 1,4 раза), более широкий температурный диапазон жидкого состояния, в том числе для ряда рецептур при

отрицательных температурах [13, 14].

Одним из компонентов топлива является вода, что позволяет обеспечивать безопасное обращение с топливом, снизить пожаровзрывоопасные характеристики топлива и температуру в камере сгорания. Разрабатываемые монотоплива на базе НГА, рассматриваются как альтернатива высокотоксичному гидразину.

Целью исследования являлось изучение острой токсичности монотоплива «ЗТ» при различных путях поступления, изучение кожно-резорбтивного действия, оценка кумулятивности монотоплива «ЗТ», установление гигиенических нормативов.

Материалы и методы исследования. Монотопливо «ЗТ» состоит из водного раствора нитрата гидроксиламмония (окислителя) и метанола (горючего) [7]. Регистрационный номер CAS: нитрат гидроксиламмония 13456-08-2, метанол 67-56-1 [10]. Состав образца монотоплива «ЗТ», который использовался в данной работе, представлен в таблице 1.

Таблица 1 – Состав образца монотоплива «ЗТ»

Состав монотоплива «ЗТ», %			Технологические примеси, %		
НГА	CH ₃ OH	H ₂ O	HNO ₃ своб.	SO ₄ ⁻²	Ba ⁺²
67,5...68,5	14,0...16,0	6,3...17,5	0,061	0,057	2,2×10 ⁻³

Монотопливо «ЗТ» представляет собой бесцветную подвижную жидкость со слабым запахом. Температура начала разложения: для стекла 172°C, для металла 120°C. Температура застывания монотоплива менее минус 87 °С. Теплопроводность 0,345 Вт/м/К при 30 °С. Давление насыщенного пара 0,05 бар при 22 °С. Удельная теплоемкость 2,44 Дж/г*К. Удельная электропроводность при 25 °С (11,17±0,19) Ом⁻¹/м. плотность 1,355 г/см³ при 20 °С [6].

Работы проводили в соответствии с Методическими указаниями и рекомендациями по исследованию токсичности и опасности вредных химических веществ в атмосферном воздухе и воздухе рабочей зоны [1-5].

Острое токсическое действие монотоплива «ЗТ» изучали при пероральном, внутривенном, внутрибрюшинном поступлении в организм экспериментальных животных, а также при кожном пути поступления.

Экспериментальные исследования проводились на белых нелинейных крысах обоих полов и мышах обоих полов. Местно-раздражающее действие изучали в конъюнктивной пробе на кроликах породы шиншилла. Оценка кумулятивных свойств монотоплива «ЗТ» проводилась по общепринятому методу Lim et al. [1, 2].

Все животные поступали в карантинное отделение вивария, наблюдение проводилось в течение 14 дней до начала проведения эксперимента. Перед началом исследования животные, отвечающие критериям включения в эксперимент, были распределены на группы с

помощью метода рандомизации. Животные, не соответствующие критериям, были исключены из исследования.

Осмотр животных осуществляли ежедневно в течение всего срока проведения эксперимента. Осмотр включал в себя оценку общего состояния и поведения животных. В дни проведения эксперимента наблюдение за животными осуществлялось в течение 6 часов после воздействия вещества.

О состоянии подопытных животных судили по комплексу интегральных, физиологических, гематологических и биохимических методов. Динамику изменения веса животных определяли в ходе проведения эксперимента на весах ВЛР-500. Внутренние органы подопытных крыс взвешивали на электронных весах 1602 MP. Перечень органов, которые подлежали взвешиванию: сердце, лёгкие, печень, почки, селезенка.

Состояние сердечно-сосудистой системы животных оценивали по ЭКГ, регистрируя показатели с помощью электрокардиографа Schiller AT-1 (США). Частоту дыхания измеряли с помощью прибора Biopac System MP150 (США). Исследование ряда гематологических показателей проводили на автоматическом анализаторе Celly 70 фирмы Biocode-Nucel France S.A. Оценку биохимических показателей проводили на автоматизированном клиническом анализаторе SAPPHIRE-400 (Tokyo Boki Ltd., Япония).

После окончания экспериментов проводились макроскопические и морфометрические исследования. Оценку цито- и генотоксического (мутагенного) действия проводили в культуре лимфоцитов периферической крови человека, с применением современных цитогенетических методов исследования.

Результаты и их обсуждение. Экспериментально установлены показатели острой токсичности монотоплива «ЗТ» при различных путях его поступления. Полученные результаты представлены в таблице 2.

Среднелетальные дозы, полученные при внутривенном и внутрибрюшинном введении, соответствуют 3 классу опасности, при накожном нанесении монотоплива «ЗТ» – 4 классу опасности.

Таблица 2 – Среднелетальные дозы монотоплива «ЗТ»

Вид животных	Путь введения	DL ₁₆	DL ₅₀	DL ₈₄
Крысы, мг/кг	в/в	88,1	192,2 (137,0÷247,4)	419,3
Мыши, мг/кг:	в/бр	196,5	227,4	263,3
самцы		196,7	219,8	245,6
Крысы, мг/кг	накожное	5000;	7500 (5950÷9450)	11000

Анализ результатов показал отсутствие различия в половой чувствительности у экспериментальных животных (крысы, мыши) к монотопливу «ЗТ» Коэффициент половой чувствительности составил 1. Коэффициент видовой чувствительности составил 1,6 (КВЧ < 3), что свидетельствует об отсутствии видовой чувствительности при внутрибрюшинном введении монотоплива «ЗТ». Монотопливо «ЗТ» обладает среднекумулятивными свойствами. Установлена его способность к функциональной кумуляции.

Проведённые макроскопические и морфологические исследования (при внутрижелудочном введении в подостром опыте) показали статистически значимое отличие весовых коэффициентов селезёнки у животных на всём протяжении эксперимента (рис.1, 2).

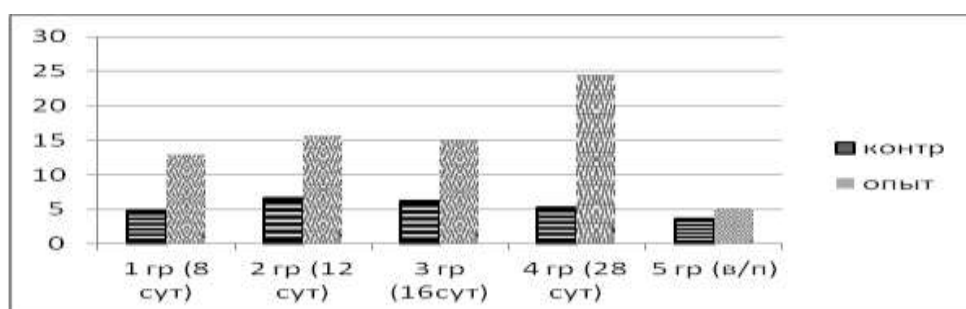


Рис. 1. – Динамика изменения весового коэффициента селезёнки у крыс самцов в подостром эксперименте.

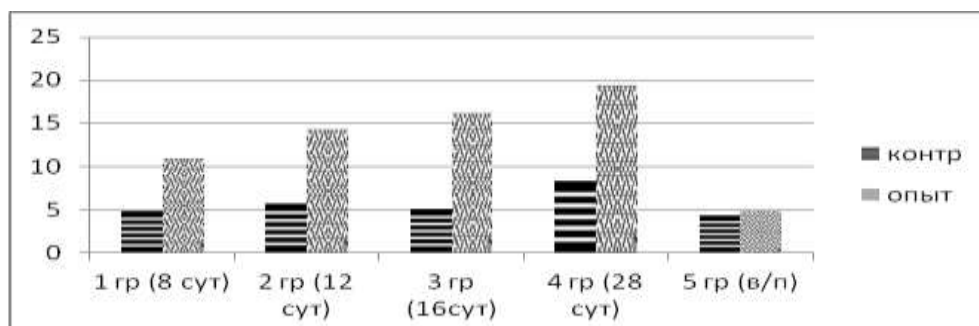


Рис. 2. – Динамика изменения весового коэффициента селезёнки у крыс самок в подостром эксперименте.

Анализ полученных результатов показал достоверное отличие весового коэффициента лёгких на 28 сутки эксперимента у самцов и самок по сравнению с контрольными группами.

Основной компонент монотоплива «ЗТ» обладает гематотоксичностью, что приводит к образованию патологической формы гемоглобина – метгемоглобина.

Прямым следствием поражения красной крови при хронической интоксикации монотоплива «ЗТ» становится вовлечение в патологический процесс ретикулоэндотелиальной системы. В результате чего у экспериментальных животных развивается спленомегалия, что было подтверждено при макроскопическом исследовании экспериментальных

животных.

Выраженная гемолитическая анемия приводит к избыточному депонированию железа в виде ферритина и гемосидерина в селезёнке.

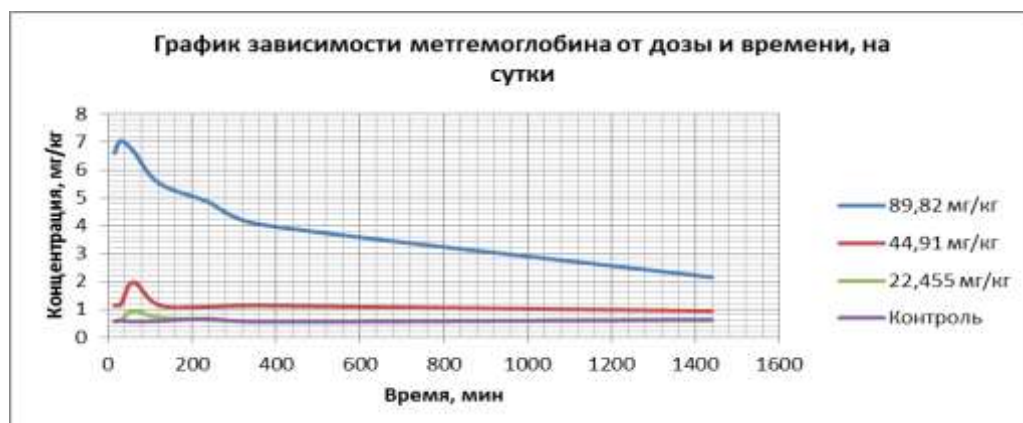


Рис. 3. – Зависимость образования метгемоглобина от дозы и времени.

Основным органом мишенью является селезёнка. Отмечена ярко выраженная спленомегалия, 4 степени по классификации Губергрица. У всех животных на 28 сутки эксперимента селезёнка смещалась в правую зону брюшной полости и имела характерный чёрный цвет.

При проведении макроскопического исследования у экспериментальных животных явлений гепатомегалии не выявлено. Однако следует указать, что печень имела очень рыхлую консистенцию и имела чёрный окрас.

Характерные изменения в крови экспериментальных животных наблюдались и при внутривенном введении (табл. 3).

Таблица 3 – Показатели крови экспериментальных животных при однократном внутривенном введении в дозе 135,7 мг/кг, $M \pm m$

Показатели	Контроль	Опыт
Общий гемоглобин, г/л	163,80±8,47	159,33±0,33
Сатурация кислорода, %	49,32±11,60	85,47±0,79
Оксигемоглобин, %	48,84±11,42	77,13±1,03
Карбоксигемоглобин, %	0,38±0,08	0,30±0,15
Метгемоглобин, %	0,62±0,04	9,43±0,91***
Дезоксигемоглобин, %	50,18±11,52	13,13±0,77
Общий билирубин, %	8,6	8,6 <

Анализ показал увеличение метгемоглобина в 15 раз по сравнению с контролем. Следует указать, что отмеченный рост сатурации кислорода, оксигемоглобина объясняется интерферрирующим влиянием высоких уровней метгемоглобина, что и приводит к повышению данного показателя. Дезоксигемоглобин – это гемоглобин, лишённый кислорода

(или восстановленный). Увеличение количества метгемоглобина приводит к снижению количества дезоксигемоглобина.

В результате биохимического исследования сыворотки крови животных было установлено достоверное изменение биохимических показателей: трансфераз, холестерина и мочевины через 24 часа после 4-х часового ингаляционного воздействия монотоплива «ЗТ». Наблюдалась повышенная показателей АЛТ и АСТ, снижался уровень холестерина в крови экспериментальных животных. Уровень мочевины возрос по сравнению с контролем на первые сутки ингаляционного воздействия монотоплива «ЗТ».

Исследование местно-раздражающего действия после однократного закапывания монотоплива «ЗТ» в глаз кроликов было отмечено возбуждение, блефароспазм. Через 4 часа – гиперемия склеры, воспаление конъюнктивы и выворот третьего века. Однако через 48 часов животные были спокойны, глаза открыты. Наблюдалась гиперемия склеры и незначительное сужение глазной щели. Патологических изменений, в последствии, не отмечалось. Состояние сосудов века и бульбарной конъюнктивы без особенностей, помутнение роговицы не наблюдалось.

Комплексное изучение цито,- эмбрио,- генотоксических, канцерогенных свойств монотоплива «ЗТ» в концентрациях 100, 10 и 1 мкг/мл с использованием двух моделей-культуры доимплантационных эмбрионов мыши и культуры лимфоцитов периферической крови человека выявило эмбриотоксическую активность монотоплива «ЗТ» при действии концентрации 100 мкг/мл, в культуре доимплантационных эмбрионов мыши. Снижение концентрации монотоплива «ЗТ» до 10 мкг/мл приводило к нормализации развития дробящихся эмбрионов.

В результате проведённых экспериментов и с помощью математического моделирования, с учётом возможности проявления отдалённых последствий, оценить которые возможно только в длительном эксперименте, ОБУВ монотоплива «ЗТ» в воздухе рабочей зоны установлен на уровне $2,0 \text{ мг/м}^3$, что соответствует 3 классу опасности.

Разработана и утверждена методика измерений массовой концентрации нитрата гидроксиламмония, основного компонента монотоплива «ЗТ», в воздухе рабочей зоны газохроматографическим методом с пламенно-ионизационным детектированием.

Литература

1. Лойт А.О., Архипова М.Б. Расчетные методы гигиенического нормирования вредных веществ в разных средах // – СПб., 1997. – 38 с.
2. Лойт А.О. Этапность токсиколого – гигиенических исследований // СПб., 2006. – 148 с.
3. Методические рекомендации по использованию поведенческих реакций животных в токсикологических исследованиях для целей гигиенического нормирования (2166-80). – М.: Киев, 1980. – 46 с.

4. Методические указания к постановке исследований для обоснования санитарных стандартов вредных веществ в воздухе рабочей зоны (№ 2163-80). – М., 1980. – 20 с.
5. Методические указания по установлению ориентировочно безопасного уровня воздействия (ОБУВ) загрязняющих веществ в атмосферном воздухе населённых мест. МУ 2630 – 82. – М., 1982 г.
6. Монотопливо «ЗТ». Руководство по эксплуатации. РЭ 04806898 - 213 -2017 г.
7. Паспорт безопасности химической продукции. Монотопливо «ЗТ». ФГУП «РНЦ «Прикладная химия», 2017 г.
8. Патент RU 2244704 С2, СВЕНСКА РЮМДАКТИЕ БОЛАГЕТ (SE), АНФЛО Челль ВИНГБОРГ Никлас (SE), 23.02.2000 10.11.2003.
9. Патент US2004088910A1, Roland Peter Van Den Berg, Petrus Johannes Maria Elands, Johannes Maria Mul (NL), 29.10.2003 13.05.2004.
10. Патент US 6047541 Secretary of the Air Force (US), Kenneth R. Hampsten; (US), 26.08.1998 11.04.2000.
11. Патент US6652682B1, Secretary of the Navy, (US), Christopher J. Fawls, Joel P. Fieds (US), 17.10.2001 25.11.2003.
12. Патент US2004088910A1, Roland Peter Van Den Berg, Petrus Johannes Maria Elands, Johannes Maria Mul (NL), 29.10.2003 13.05.2004.
13. Wei C. Y., Rogers, W. J., Mannan M. S. Termal decomposition hazard evaluation of hydroxylamine nitrate // J. Hazard Mater. – 2006. – N 130 (1-2) – P. 163 – 168.
14. Wei C. Y., Shaw, B. D. Influences of pressure on reduced – gravity combustion of HAN – methanol – water droplets in air // Combustion and Flame. – 2006. – 140 (3). – P. 484 – 492.

РАЗРАБОТКА ХИМИЧЕСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ СОВРЕМЕННЫХ АНТАГОНИСТОВ ОПИОИДНЫХ РЕЦЕПТОРОВ

А.С. Радилов, С.А. Дулов, Д.В. Криворотов, В.В. Абзианидзе,
В.А. Кузнецов

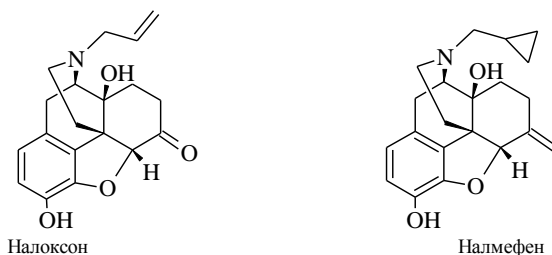
*ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия
denhome@bk.ru*

Развитие медицинской химии природных и синтетических препаратов, влияющих на центральную нервную систему (ЦНС), способствует как созданию прогрессивных анестезиологических средств, так и развитию в обществе некоторых опасных и социально-значимых заболеваний [1, 2].

С учетом того, что многие опиоидные анальгетики обладают высокой физиологической активностью, их неконтролируемое использование несёт риски для жизни и здоровья людей.

Современные медицинские стандарты терапии отравлений опиоидными анальгетиками подразумевает применение в качестве средств лечения антагонистов опиоидных рецепторов.

Основным лекарственным препаратом, применяемым с этой целью в отечественной реаниматологической практике, является налоксон, разрешённый для применения в Российской Федерации более 30 лет назад. В тоже время, отмечаются недостатки налоксона, связанные с малым временем его действия ($T_{1/2}$ – 30-80 минут) и неспособностью эффективно противостоять некоторым длительно действующим анальгетикам, например метадону. Это обуславливает потребность в более адекватных по фармакологическому действию средств лечения отравлений анальгетиками центрального действия. Отмечается, что в качестве перспективного средства антидотной терапии при лечении отравлений опиоидами может рассматриваться полусинтетический антагонист опиоидных рецепторов налмефен [1].



Налмефен обладает хорошо-прогнозируемым фармакокинетическим профилем, длительным временем действия ($T_{1/2}$ – 10-12 часов) и значительной липофильностью, обеспечивающей эффективный транспорт препарата к его фармакологическим мишеням в организме человека. Назначение и лекарственная форма зарегистрированного в РФ препарата налмефена не позволяют его использовать как антидот. В руководстве [1] отмечается, что в США, налмефен был разрешен и для лечения отравлений опиоидными анальгетиками при его применении в адекватной лекарственной форме, что делает задачу разработки химической технологии синтеза налмефена актуальной.

Разработанная оригинальная химическая технология синтеза налмефена с помощью реакции Виттига позволяет получать его субстанцию с высоким выходом и нормированными показателями качества, что открывает перспективы для фармацевтической разработки его готовых лекарственных форм соответствующих задачам наркологии, реаниматологии и антидотной терапии.

Литература

1. Антидотная терапия отравлений высокотоксичными веществами в условиях чрезвычайных ситуаций. Руководство / Под ред. В.Д. Гладких, С.Х. Сарманаева, Ю.Н. Остапенко // Федеральное медико-биологическое агентство. М.: Комментарий, 2014. – 272 с.
2. Булаев В.М. Рецепторы опиатов и их лиганды // Итоги науки и техники: Сер. Фармакология. Химиотерапевт. средства. М.; ВИНТИ, 1982. – № 13. – С. 101–184.

ПРОБЛЕМЫ ОБЕСПЕЧЕНИЯ САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ В РАКЕТНО-КОСМИЧЕСКОЙ ОТРАСЛИ И ПУТИ ИХ РЕШЕНИЯ

А.С. Радилев, И.Е. Шкаева, М.Ю. Комбарова
ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия
gpesh@fmbamail.ru

Развитие космонавтики в России в 60-е годы прошлого столетия, создание ракетной техники и ракетно-космического комплекса для освоения приземного и космического пространства сопровождались крупномасштабными исследованиями по поиску КРТ, отработке технологии их получения, а также проектированию и разработке ракетных двигателей на основе жидких и твердых ракетных топлив, созданию ракетных полигонов и космодромов для запуска ракет и космических кораблей. Поиск новых ракетных топлив, как правило, проводится среди соединений, обладающих значительными энергетическими характеристиками и высокой реакционной способностью. Подобные соединения, чаще всего, являются высокотоксичными и могут оказывать вредное воздействие на человека и окружающую природную среду.

Институт (ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России) со дня основания (в 1962 г на базе филиала №3 Института биофизики МЗ СССР) под руководством Сергея Дмитриевича Заугольниковца осуществлял обеспечение санитарно-эпидемиологической безопасности ракетно-космической деятельности (РКД) на каждом из этапов создания и испытания ракет и космических кораблей. Токсиколого-гигиеническое сопровождение разработки новых химических соединений проводилось, начиная с этапа лабораторного синтеза, до внедрения новых топлив в эксплуатацию, с последующей клинико-гигиенической верификацией гигиенических нормативов в условиях производства.

Системный характер работ с применением комплекса токсикологических, гигиенических, санитарно-экологических, химико-аналитических и клинико-эпидемиологических исследований по обеспечению химической безопасности при функционировании опасных объектов ракетно-космической отрасли, определял успешность выполнения поставленных задач. На стадии поиска и лабораторного синтеза проведены экспертные оценки токсичности и опасности большого количества (более 600) веществ, предполагаемых к использованию в качестве КРТ, меньшее количество веществ (в качестве РТ) исследовано в полном объеме. На основании анализа проектно-технической документации и результатов медико-гигиенических и экологических исследований при работе с КРТ в 2003–2005 гг. были разработаны основы правового регулирования в области обязательных требований по обеспечению санитарно-эпидемиологической безопасности для каждой регламентно-технической стадии ракетно-космической деятельности (лабораторные опытные установки по изысканию КРТ, опытные и опытно-

промышленные производства КРТ, испытательные стенды, установки запуска ракет и космических кораблей, объекты по утилизации ракетных топлив).

За последние годы (2009 – 2016 гг.) в результате токсиколого-гигиенических исследований по обеспечению химической безопасности в ракетно-космической отрасли достигнуто следующее:

- проведена оценка токсичности и обоснованы гигиенические нормативы НДМГ при накожном поступлении: ПДУ на коже, ПДУ загрязнения СИЗ, ОДК в подкостюмном пространстве;

- разработан комплекс лабораторных методов диагностики интоксикаций КРТ (НДМГ) и веществ, образующихся в ходе утилизации ракетного вооружения (металлов),

- проведен эпидемиологический анализ и систематизация материалов, связанных с обследованием лиц, работавших на предприятиях, эксплуатировавших ракетно-космическую технику, на основе которых создана база данных синдромов интоксикаций КРТ;

- экспериментально обоснованы новые методы лечения интоксикаций КРТ и продуктами их деструкции;

- разработана компьютерная программа дифференциальной диагностики отравлений КРТ, продуктами их получения и деструкции;

- разработаны предложения по пересмотру и гигиенических нормативов и нормативных документов по обеспечению безопасности при работах с НДМГ;

- разработан пакет нормативно-методической документации по медицинскому обеспечению и санитарно-эпидемиологической безопасности при утилизации ракетного вооружения.

- проведено организационно-методическое обеспечение деятельности Центров профпатологии по проведению обследований и экспертизе профессиональных заболеваний, поддержание в готовности клинично-токсикологических бригад быстрого реагирования при чрезвычайных ситуациях в ходе утилизации ракетных вооружений и компонентов ракетных топлив».

- разработаны паспорта ряда предприятий ракетно-космической отрасли (Государственный ракетный центр имени академика В.П. Макеева, г. Миасс, Челябинская область, Опытный завод ФГУП «РНЦ «Прикладная химия», (г.п. Кузьмолковский Ленинградской области).

Однако следует отметить, что к настоящему времени большая часть ряд токсиколого-гигиенических и медицинских исследований в области РКД нуждаются в актуализации, в том числе необходимо учитывать особенности функционирования отрасли на современном этапе ее технического развития.

Необходимо также провести изучение токсичности и опасности химических веществ, используемых в РКД (как КРТ, так и общепромышленных), в соответствии с современными требованиями к

оценке воздействия химического фактора на организм, на основе последних достижений в области биологии, химии и токсикологии.

Целесообразна систематизация и экспертиза технических и токсикологических характеристик ранее созданных химических соединений в качестве перспективных ракетных топлив, что может повысить эффективность и безопасность РКД. Кроме этого, с целью дальнейшего усовершенствования системы обеспечения санитарно-эпидемиологической безопасности работ с КРТ необходимы следующие организационные меры:

- создание и введение в эксплуатацию единого информационно-аналитического центра по обеспечению организаций, связанных с РКД, в том числе проводящих необходимые токсиколого-гигиенические и медицинские исследования на базе ФМБА России, нормативно-методической документацией и полной информацией об изменениях медико-гигиенической ситуации при работах с КРТ;

- создание единой системы мер безопасности при производстве и утилизации ракетных топлив, включающую разработку токсиколого-гигиенического мониторинга объектов по разработке, производству и уничтожению ракетного вооружения и ракетных топлив;

- организация системного мониторинга здоровья персонала и населения, проживающего в районе расположения ракетной техники;

- обоснование критериев индивидуального прогноза, риска развития донозологических изменений и профессиональных заболеваний на основе изучения роли генетико-биохимического статуса в ответных реакциях организма на воздействие КРТ.

Очевидно, что организация и внедрение в практику вышеприведенных мероприятий позволит сохранить здоровье персонала и населения, проживающего в районе расположения объектов ракетно-космической деятельности.

ПЕРСПЕКТИВЫ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ ТОКСИКОЛОГИИ

В.Р. Рембовский, Л.А. Могиленкова

ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

gpech@fmbamail.ru

Введение. Токсикология окружающей среды имеет дело с потенциально вредными влияниями на биологические объекты химических токсикантов, содержащихся в воде, воздухе, почве, продуктах питания, бытовой химии и других объектах среды обитания человека [7, 9, 10].

Вместе с тем в рамках дифференциальной диагностики и установления этиопатогенеза химически обусловленного заболевания как динамического процесса не достаточно учитываются генетические и другие индивидуальные особенности работников химически опасных объектов (ХОО), контактирующих с химическими соединениями, достаточно редко применяются методы биомониторинга. Это снижает

выявление и доказательность причин нарушения здоровья конкретных лиц. В связи с отмеченным, целью исследования явилось обоснование нового перспективного направления промышленной медицины – персонализированной токсикологии, изучающей влияние химических токсикантов на индивидуальном уровне.

Материалы, методы и результаты. Проведен анализ литературных данных по оценке современных методологических подходов, генетических, биохимических и других клинико-диагностических методов для выявления воздействия химических веществ на организм человека в рамках развития нового раздела токсикологии – персонализированной токсикологии. Современные фундаментальные медико-биологические исследования позволяют углубить изучение влияния химических загрязнителей на здоровье лиц, контактирующих с ними, на индивидуальном уровне, на которое обращалось внимание с времен древней медицины. Еще Гиппократ и Авиценна выделили несколько градаций здоровья. Задачу врача Гиппократ видел в изучении индивидуальных особенностей больного, в обеспечении мобилизации сил организма для восстановления здоровья. Проблемы индивидуального подхода касались И.М. Сеченов, С.П. Боткин, И.П. Павлов, Н.М. Амосов, Г.Л. Апанасенко и др.[11]. И.И. Брехман разработал методологические основы сохранения и укрепления здоровья практически здоровых людей [2]. Он пришел к заключению о необходимости изменить всю стратегию здравоохранения путем изучения этиологии, диагностики качества и количества здоровья индивида. Зарубежными аналогами валеологии являются направления «health promotion» и «health education».

Во многих странах активно внедряется методология персонифицированной медицины, направленная на выявление рисков возникновения заболевания у конкретного больного, пациентоориентированное лечение и реабилитацию в соответствии с данными определения индивидуального генетического профиля. Годом рождения персонифицированной (персонализированной) медицины считается 1998 г., когда впервые появился термин «personalized medicine» [13].

Эта «медицина 4П» основывается на четырех базовых принципах: *предиктивности* (предсказательности) – прогнозировании заболевания на основе индивидуальных особенностей генома (вероятностный прогноз здоровья на основании генетических исследований); *превентивности* – предотвращении заболеваний с помощью их профилактики; *персонализации* – индивидуальном подходе к больному и создании уникального генетического паспорта для лечения и контроля за здоровьем пациента; *партисипативности* – активном участии пациента в улучшении своего здоровья.

В Российской Федерации основателем предиктивной, профилактической, индивидуальной медицины явился В.С. Баранов,

который в 1998 – 2000 гг. разработал ее методологию и обосновал «генетический паспорт» человека [4].

В настоящее время стали применяться приемы персонализированной диагностики при изучении биологического действия опасных химических веществ, что представляет перспективу развития на базе аналитической и молекулярной токсикологии нового раздела – персонализированной токсикологии (рис. 1).



Рис. 1. – Современные направления токсикологии.

Современный этап развития персонализированной токсикологии связан с ассимиляцией достижений теоретической медицины, разработкой и применением эффективных методов и средств молекулярной биологии, аналитической химии, математического моделирования. Персонализированный подход также развивает метод доказательной медицины, используя сравнение множества измерений биологических параметров биомаркеров, отслеженных в течение жизни пациента. Заключение о важности измеренного уровня биомаркера принимается с учетом долгосрочной динамики молекулярного профиля индивида и статистической значимости выявленных отклонений, отражающих изменение здоровья в зависимости от условий жизни.

На основе молекулярной медицины расширяются возможности диагностики показателей различных патологических состояний, процессов биотрансформации, функционирования иммунной, антиоксидантной систем, нейрогуморальной регуляции гомеостаза [10].

Составление генной сети профзаболевания или производственно обусловленного заболевания у индивидуумов, идентификация в ней центральных генов и генов-модификаторов, анализ ассоциации их полиморфизма, а также эпигеномных изменений с состоянием систем обеспечения гомеостаза и развитием соответствующего заболевания по данным комплексных клинико-гигиенических исследований, включая биомониторинг, является основой персонализированной токсикологии.

Следует отметить, что при количественной оценке состояния здоровья индивидуума общепринятое понятие «норма» наполняется новым смыслом.

Эта среднестатистическая величина, в традиционном ее понимании важная для выявления тенденций состояния здоровья в группах наблюдения, не может быть принята за исходную позицию при индивидуальном наблюдении, так как в ней не учитываются индивидуальные дозы веществ, поступающих в организм и гено- и фенотипические особенности реакции организма конкретного человека. Патогенетически значимые показатели изменения состояния здоровья индивида надо рассматривать в динамике относительно исходных уровней, а не только среднестатистических величин.

Так, по клинико-эпидемиологическим материалам, токсическая реакция на химический агент может быть значительно усилена при комбинации двух токсико- или фармакокинетических дефектов индивидуума [4, 6], поэтому у лиц, подвергающихся одинаковому уровню воздействия опасного химического вещества, величины эффекта могут отличаться на два или три порядка.

Взаимодействие химического и наследственных факторов, обуславливающих нарушение различных звеньев гомеостаза, развитие многофакторных и других заболеваний химической этиологии, представлено на рисунке 2.



Рис. 2. – Взаимовлияние химического и наследственных факторов на здоровье человека.

Генетический полиморфизм ядерных генов, кодирующих ферменты первой (изоферменты цитохрома Р-450, дигидропиримидин дигидрогеназа, бутирилхолинэстераза, параоксоназа и др.), второй фазы метаболизма (N-ацетилтрансфераза, глутатионтрансферазы, тиопурин S-метилтрансфераза, эпоксид гидролаза и др.), а также третьей фазы биотрансформации (гликопротеин Р и др.) может приводить к синтезу ферментов с изменённой активностью и соответственно влиять на скорость биотрансформации лекарственных средств (ЛС) и ксенобиотиков (замедление или ускорение). Выделено 3 группы индивидуумов, различающиеся по активности того или иного фермента биотрансформации (быстрые, медленные и «нормальные» метаболизаторы) [7]. Наличие «медленных» аллелей в генах, кодирующих изоферменты биотрансформации, приводит либо к отсутствию синтеза этих ферментов или к синтезу ферментов с низкой активностью и усилению токсического

эффекта (*CYP2D6; CYP2C19, PON1, BCHA, GSTT1, GSTM1, GSTP1, NAT* и др.). Отмечено, что у человека наиболее активно в метаболизме мутагенов/канцерогенов участвуют изоформы цитохрома P450 (*CYP1A1, CYP1A2, CYP2A6, CYP2E* и *CYP3A4*).

При оценке влияния химического фактора на здоровье людей важно, что конечная токсичность любого посредника, образуемого предыдущей фазой детоксикации, зависит от реакций последующей фазы, сочетанной роли полиморфизмов генов, кодирующих ферменты, другие компоненты обезвреживания токсических веществ и поддержания гомеостаза в организме. Кроме того, необходима оценка влияния химического фактора на митохондриальный геном, так как митохондриальная наследственность (материнская) является более уязвимой к возникновению спонтанных мутаций, чем ядерная ДНК [1]. Отмечено, что ДНК митохондрий млекопитающих (и человека), которая кодирует синтез всех специфичных для системы окислительного фосфорилирования ферментов, в том числе железо-серных белков, также более уязвима к воздействию внешних факторов (фенолы, ПАУ, соли кадмия, некоторые гормоны и др.).

Мутации в митохондриальном геноме отличаются от ядерных мутаций по способу только материнского наследования. Митохондрии не подвергаются митозу, поэтому в процессе клеточного деления они распределяются между дочерними клетками случайным образом. В клетках млекопитающих отсутствует обмен генетическим материалом между митохондриями и ядром, поэтому потеря «нормального» генетического материала для энергообеспечения митохондриями основных адаптивных органов (в первую очередь печени) невозможна. Для митохондриальных генов характерен неменделевский (цитоплазматический) тип наследования, вследствие чего может появиться спонтанная митохондрия с мутантной ДНК, инициирующая развитие популяции опухолевых клеток. Под влиянием генотоксических агентов (или спонтанно) мутация митохондриальных генов может способствовать нарушению клеточного дыхания.

Показано, что на индивидуальную предрасположенность к действию химических веществ влияют полиморфизмы генов субстратов, участвующих в процессах, связанных с патогенезом воздействия конкретных ксенобиотиков, а также гены, обуславливающие развитие «стохастического» разнообразия патологии органов и систем [4].

Выявлены группы генов, связанные с функциями органов и отдельных систем, а также ассоциации некоторых аллелей генов с развитием определенной патологии (фенотипами). То есть при дифференциальной диагностике химически обусловленных заболеваний необходимо изучать и стратифицировать «фоновый» уровень генетического полиморфизма в популяции, сильно влияющий на индивидуальную токсичность. Важно оценивать вклад в развитие болезней

образа жизни (особенности питания, табакокурение, употребление алкоголя, стресс и т.д.), пола, возраста, наличия заболеваний.

Информация о фенотипе содержится не только в геноме, но и в эпигеноме, который пластичен и может, изменяясь под воздействием определенных средовых стимулов, влиять на активность генов и проявления фенотипа [9].

В отличие от генома, одинакового для всех клеток организма, эпигеном является важным фактором дифференцировки клеток, ведущим к появлению выраженных эпигенетических отличий между клетками разных типов. Эпигенетические изменения обратимы, но могут существенно менять гомеостаз человека (в том числе метаболизм), вызывать развитие различных заболеваний, передающихся потомству [3, 9]. Наиболее распространенным эпигенетическим механизмом является метилирование ДНК, считающееся одной из основных причин подавления экспрессии генов. Модификации гистонов (ацетилирование, деацетилирование, фосфорилирование и др.) изменяют силу взаимодействия между ДНК и гистонами, влияя на доступность нуклеотидных последовательностей для факторов транскрипции и изменяя скорость транскрипции [5].

Малые интерферирующие РНК изменяют стабильность и трансляцию матричной РНК путем моделирования функций полисом и структуры хроматина. Почти 80% генома человека находится под регуляцией микроРНК, играющих большую роль в развитии МФЗ. Одна микроРНК может регулировать работу сотни генов, а один ген может регулироваться десятками микроРНК.

Показано, что индуцированные определенными стимулами эпигенетические изменения обычно воспроизводятся в ряду клеточных поколений в пределах жизни одного организма. Они могут передаваться в следующие генерации до 3-4 поколения.

На токсический ответ организма также влияет микробиота – первичный защитный барьер организма [12]. Микроорганизмы, живущие в тканях и органах человека, могут воздействовать на экспрессию его генов, в том числе посредством своих ДНК и РНК, включая микроРНК, влияя на фенотип организма-хозяина.

Из современных достижений молекулярной биологии, для индивидуальной диагностики в персонализированной токсикологии наряду с генетическими, традиционными клинико-физиологическими, биохимическими, иммунологическими и другими методами важно использование омиксных технологий [6, 8].

Многие из данных методик в настоящее время активно развиваются как в направлении увеличения точности и информативности измерений, так и в способах численной обработки получаемых данных. В токсикологии наибольшее значение имеет развитие токсимики – оценки изменения метаболома, транскриптома, генома, эпигенома, метабонома и других «омиков» для изучения молекулярных и клеточных процессов,

связанных с особенностями проявления токсичности разнообразных ксенобиотиков.

Разработка новых токсикологических тестов с помощью токсома человека, методов аналитической токсикологии преимущественно в опытах *in vitro* должна упростить тестирование ксенобиотиков, лекарственных и пищевых веществ, сохранить жизни лабораторных животных.

Заключение. Внедрение методологии персонализированной токсикологии может явиться прорывом в лабораторной диагностике химически обусловленных заболеваний. Новыми перспективными направлениями оценки влияния химического фактора на организм при работах на ХОО и различных инцидентах являются: 1) количественное определение токсичных химикатов, их метаболитов, аддуктов с белками, ДНК, РНК в биосредах, 2) оценка генетико-эпигенетических особенностей реакции организма, 3) генетическое изучение состава микробиоты (аутомикрофлоры), 4) установление индивидуальной чувствительности – комплексное тестирование на генетическую предрасположенность (резистентность) к болезни как ключевого звена сложной иерархии взаимоотношения химического вещества с конкретным организмом.

Изучение многогранной сети взаимосвязей «геном – эпигеном – фенотип» в системе обеспечения гомеостаза организма, определение параметров патогенетически значимых показателей и представление их взаимозависимости в виде уравнений, поиск информационных сведений, наполнение ими баз данных регистров здоровья, наиболее эффективно для оценки донозологических проявлений и своевременного выявления пострадавших при работах с опасными химическими веществами.

Персоналицированные молекулярно-генетические исследования лиц, контактирующих с химическими токсикантами, являются основой для разработки адресных рекомендаций по профилактике, диагностике, индивидуальному подбору терапевтических средств и схем лечения, мер улучшения качества и увеличения продолжительности жизни.

Литература

1. Береговская Н.Н., Савич А.В. Возможное кодирование железосерных белков в митохондриальном геноме млекопитающих // Биополимеры и клетка. – 1988. – Т. 4, № 6. – С. 238–245.
2. Брехман И. И. Валеология – наука о здоровье. – 2-е изд., доп., перераб. – М.: Физкультура и спорт, 1990. – 208 с.
3. Вайсерман А.М., Войтенко В.П., Мехова Л.В. Эпигенетическая эпидемиология возраст-зависимых заболеваний // Онтогенез. – 2011. – Т. 42, № 1. – С. 30-50.
4. Генетический паспорт – основа индивидуальной и предикативной медицины / Под ред. В.С. Баранова. – СПб.: Изд-во Н-Л, 2009. – 528 с.
5. Деацетилирование гистонов (выключение генов) [Электронный

ресурс]. emet.in.ua>xanthin/OLIGOPEPTIDY_I_POLIPEPTIDY

6. Клиническая фармакогенетика: Учебное пособие / Под ред. В.Г. Кукеса и Н.П. Бочкова. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. – 248 с.
7. Куценко С.А. Основы токсикологии // СПб.: Фолиант, 2004. – 720 с.
8. Биомолекула.ру: «Омики» – эпоха большой биологии biomolecula.ru/content/1387
9. Паткин Е.Л., Квинн Дж. Эпигенетические механизмы предрасположенности к комплексным патологиям человека // Экологическая генетика. – 2010. – Т. 8. – С. 44-56.
10. Рембовский В.Р., Могиленкова Л.А. Естественные процессы детоксикации химических веществ, загрязнителей среды обитания человека // Биомедицинский журнал – Medline.ru. – 2015 – №16. – С. 216–239.
11. Тихомирова И.А. Физиологические основы здоровья. Краткий курс лекций по валеологии. – Ярославль: ГОУ ВПО "Ярославский ГПУ университет, 2007.
12. Ткаченко Е.И., Орешко Л.С., Ситкин С.И. Гастроэнтерология XXI века с позиций многомерной биологии // Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. – 2012. – № 2-3. – С. 2–4.
13. Jain K.K. Personalized Medicine // Decision Resources Inc. Waltham, MA, USA. – 1998.

СИНТЕЗ МОНООКСИГЕНАЗЫ CYP1A1 В СЕМЕННИКАХ И ЯИЧНИКАХ ИНБРЕДНЫХ ЛИНИЙ МЫШЕЙ ПРИ ТОКСИЧЕСКОМ ВОЗДЕЙСТВИИ

М.А. Сайтгалина, В.Б. Попов

*ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия
gpech@fmbamail.ru*

Введение. Цитохром Р450-зависимые монооксигеназы в определенных условиях являются одной из основных прооксидантных систем клетки. Окислительные процессы с участием этих ферментов сопровождаются образованием активных форм кислорода и затем продуктов перекисного окисления липидов, которые способны повреждать макромолекулярные и клеточные структуры. Свободнорадикальное окисление играет ключевую роль в патогенезе многих заболеваний [4].

Изучение работы генов, контролирующих активность ферментов микросомальной монооксигеназной системы цитохрома Р-450, может быть полезным, в частности, для выявления нарушений функций женской и мужской репродуктивных систем, вызванных действием токсичных факторов.

Ферменты, во-первых, играют важную роль в эндогенном метаболизме стероидных гормонов, желчных кислот, ненасыщенных жирных кислот, фенольных метаболитов, во-вторых, участвуют в первой фазе биотрансформации поступающих извне химических соединений

(ксенобиотиков) путем образования в молекуле гидрофильных функциональных групп [1].

Один из наиболее известных представителей семейства цитохрома P450 – цитохром P450 1A1 (арилгидрокарбонкарбоксилаза), кодируемый геном *CYP1A1*.

Взаимодействуя с полициклическими ароматическими углеводородами (ПАУ, например, с диоксином, бензапиреном, метилхолантреном), цитоплазматический арилгидрокарбонный рецептор (AhR) индуцирует синтез микросомального белка CYP1A1, который участвует в окислении ксенобиотиков, что и является первой ступенью их биотрансформации и детоксикации [2].

Количественное определение уровня мРНК CYP1A1 в тканях подопытных животных с помощью ПЦР в режиме реального времени позволяет оценить степень взаимодействия ксенобиотиков с AhR и степень опасности их токсического влияния.

Установлено, что количество транскриптов CYP1A1 в репродуктивных тканях мышей увеличивается в несколько раз после введения животным препаратов с описанной выше молекулярной структурой [3].

Целью данной работы являлась проверка транскрипционной активности монооксигеназы CYP1A1 в яичниках и семенниках мышей после введения представителя ПАУ Б(а)П и доксорубина.

Доксорубин относится к антрациклиновым антибиотикам, его молекула имеет тетрациклическую структуру, соединенную гликозидной связью с аминсахаром (Рис 1).

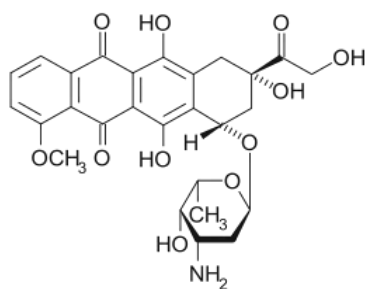


Рис 1. – Химическая формула доксорубина: $C_{27}H_{29}NO_{11}$

Материалы и методы. Затравка животных. В эксперименте для сравнительного анализа использовали самцов и самок двух инбредных линий мышей C57Bl/6 и DBA/2. Доксорубин вводили внутривенно однократно самцам в дозе 10 мг/кг, самкам – 6 мг/кг. Семенники и яичники извлекали на разных стадиях сперматогенеза и оогенеза. Семенники – на 9, 27, 36 сутки после введения препарата, яичники – на 2, 4, 6, 22 сутки. Для каждой точки анализировали по три семенника и по три яичника.

Кроме этого, для сравнения, параллельно провели затравку мышей тех же линий ПАУ. Еженедельно подкожно в течение 5 недель самцам и

самкам вводили бензапирен (Б(а)П) в дозе 50 мг/кг.

Выделение нуклеиновых кислот и синтез кДНК. Фракцию тотальной РНК из образцов выделяли фенол-хлороформным методом с использованием коммерческого набора «РНК-Экстран» («Синтол», Россия) согласно инструкциям производителя.

Во избежание попадания примесей геномной ДНК все пробы были обработаны ДНКазой («RNase-Free DNase I», «Epicentre», США) при 37°C в течение 20 минут и при 70°C в течение 15 минут для инактивации фермента. Концентрацию выделенной РНК измеряли на флуориметре Qubit2.0 («Life Technologies», США).

Для синтеза кДНК использовали 1 мкг тотальной РНК каждого образца и фермент – обратную транскриптазу MMLV-RT, который входит в состав коммерческого набора «ОТ-1» («Синтол», Россия). К аликвотам РНК добавляли по 1 мкл олиго(dT)15 праймера и по 1 мкл вырожденного Random(dN)10 праймера, доводили объем смеси стерильной водой до 13 мкл и инкубировали при 70°C в течение 5 минут затем быстро переносили на лед.

После этого в каждый образец добавляли по 10 мкл 2,5X реакционной смеси для обратной транскрипции, 1 мкл ингибитора РНКазы и 1 мкл фермента MMLV-RT. Реакционную смесь инкубировали при температуре 37°C в течение 60 мин, затем реакцию останавливали прогреванием смеси при 70°C в течение 10 мин.

ПЦР в режиме реального времени. Изменение экспрессии гена *CYP1A1* в тканях подопытных животных нормировали по гену домашнего хозяйства, β -актину. Для проведения ПЦР были использованы следующие пары праймеров («Синтол», Россия):

CYP1A1 forward: CCT CAT GTA CCT GGT AAC CA

CYP1A1 reverse: AAG GAT GAA TGC CGG AAG GT

β -актин forward: GTT GCT ATC CAG GCT GTG

β -актин reverse: TGA TCT TGA TCT TCA TTG TG

ПЦР проводили с использованием реакционной смеси qPCRmix-HS SYBR («Евроген», Россия) в амплификаторе Bio-Rad C100 с оптическим модулем CFX96, США. Для этого в каждой пробирке смешивали по 13 мкл стерильной воды, 5 мкл реакционной смеси, 2 мкл прямого и обратного праймера и по 3 мкл ДНК-матрицы (3 мкл воды в пробирке с отрицательным контролем).

Программа амплификации: 95°C – 5 мин; 38 циклов: 95°C – 15 сек, 60°C – 15 сек, 72°C – 30 сек; 72°C – 5 мин. После завершения реакции строили кривые плавления для проверки специфичности амплифицируемого продукта. Изменения экспрессии изучаемого гена в тканях рассчитывали с помощью $\Delta\Delta C_t$ метода.

Результаты и обсуждение. В таблице 1 приведено сравнение изменения уровня экспрессии гена *CYP1A1* в яичниках мышей C57Bl/6 и DBA/2 после затравки доксорубицином и бензапиреном. Так как Б(а)П

является изученным лигандом Ah рецептора, после затравки Б(а)П яичники забирали только на 2 и 4 сутки для сравнения.

Ранее уже был показан генетический полиморфизм индуцибельности гена *CYP1A1* среди инбредных линий мышей. Некоторые линии (к ним относится линия C57Bl/6) чувствительны к индукции ПАУ-соединениями, другие (DBA/2) – слабо реагируют на них. Мыши C57Bl/6 значительно превосходят DBA/2 в индукции *CYP1A1*, летальности при острых воздействиях, тератогенности и т.п. [5].

В нашем эксперименте эти данные подтверждаются: после затравки Б(а)П уровень мРНК монооксигеназы *CYP1A1* в яичниках мышей линии C57Bl/6 увеличивается примерно в 7,5 раз и на 2, и на 4 сутки, у мышей линии DBA/2 – примерно в 2 раза.

При воздействии доксорубицином количество мРНК *CYP1A1* в яичниках тоже увеличивается, но в меньшей степени. У мышей линии C57Bl/6 - примерно в 2 раза, у линии DBA/2 уровень экспрессии этого гена почти не изменяется (кроме 6 суток, где экспрессия этого гена повышена примерно в 3 раза по сравнению с контролем).

Можно предположить, что доксорубицин также может выступать в качестве лиганда Ah рецептора и индуцировать синтез мРНК *CYP1A1*. При этом, так же, как и в случае с ПАУ, линия C57Bl/6 является более чувствительной к воздействию лиганда.

Таблица 1. – Сравнительный анализ изменения экспрессии гена *CYP1A1* в яичниках двух инбредных линий мышей C57Bl/6 и DBA/2 после воздействия доксорубицином и бенз(а)пиреном

Время после затравки	Доксорубицин		Бенз(а)пирен	
	C57Bl/6	DBA/2	C57Bl/6	DBA/2
	ER <i>CYP1A1</i> *	ER <i>CYP1A1</i>	ER <i>CYP1A1</i>	ER <i>CYP1A1</i>
2 сутки	2,15	0,26	7,65	2,45
4 сутки	2,42	1,25	7,75	1,89
6 сутки	1,97	3,18	-	-
22 сутки	2,50	0,56	-	-

*ER *CYP1A1* – уровень экспрессии гена *CYP1A1* после затравки относительно контрольных образцов.

В опытах с самцами также было показано, что линия C57Bl/6 является более чувствительной к воздействию доксорубицином. Выявлено, что на 9 сутки после введения доксорубицина в семенниках мышей линии C57Bl/6 наблюдалось резкое увеличение содержания мРНК *CYP1A1*, в среднем в 100,96 раз по сравнению с контрольными образцами, в то время как у мышей линии DBA/2 экспрессия этого гена увеличилась только в 6,27 раз (табл. 2).

На 27 сутки после введения препарата экспрессия монооксигеназы увеличивалась в 67,70 раз у C57Bl/6 и в 36,99 у DBA/2. И на 36 сутки: в 70,33 раза у C57Bl/6 и в 16,87 у DBA/2. После введения Б(а)П семенники иссекали только на 36 сутки. На этой стадии экспрессия CYP1A1 в семенниках увеличена в 79,78 раз у мышей линии C57Bl/6 и не изменяется у мышей линии DBA/2 по сравнению с контролем.

Таблица 2 – Сравнительный анализ изменения экспрессии гена CYP1A1 в семенниках двух инбредных линий мышей C57Bl/6 и DBA/2 после воздействия доксорубицином и бенз(а)пиреном

Время после затравки	Доксорубицин		Бенз(а)пирен	
	C57Bl/6	DBA/2	C57Bl/6	DBA/2
	ER CYP1A1*	ER CYP1A1	ER CYP1A1	ER CYP1A1
9 сутки	100,96	6,27	-	-
27 сутки	67,70	36,99	-	-
36 сутки	70,33	16,87	79,78	0,80

*ER CYP1A1 – уровень экспрессии гена CYP1A1 после затравки относительно контрольных образцов.

Полученные данные свидетельствуют о том, что доксорубицин, молекулы которого имеют циклическую структуру, напоминающую структуру ПАУ, также является лигандом Ah рецептора и способен индуцировать экспрессию гена монооксигеназы CYP1A1.

При этом, так же, как и в случае с ПАУ, линия мышей C57Bl/6 является более чувствительной к воздействию лиганда, по сравнению с линией DBA/2. Индукция транскрипции гена CYP1A1 может служить маркером токсического эффекта доксорубицина в репродуктивных органах.

Литература

1. Кулинский В.И. Обезвреживание ксенобиотиков // Соросовский образовательный журнал. – 1999. – № 1. – С. 8–12.
2. Conney A.H. Induction of microsomal enzymes by foreign chemicals and carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons: G.H.A. Clowes Memorial Lecture // Cancer Research. – 1982. – V. 42. – P. 4875–4917.
3. Mattison D.R., Singh H., Takizawa K. and Thomford P.J. Ovarian toxicity of benzo(a)pyrene and metabolites in mice // Reprod. Toxicol.. – 1989. – V. 3. – P. 115–125.
4. Nebert D.W. Drug-metabolizing enzymes, polymorphisms and interindividual response to environmental toxicants // Clin. Chem. and Lab. Med. – 2000. – V. 38, N 9. – P. 857–861.
5. Nebert D.W., McKinnon R.A. Cytochrome P450: evolution and functional diversity // Progress in Liver Diseases. – 1994. – V. 12 – P. 63–97.

МЕХАНИЗМЫ АДАПТАЦИИ ОРГАНИЗМА К ДЕЙСТВИЮ ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ

Г.И. Сидорин, Л.В. Луковникова

ФГБУН ИТ ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

sidorin.g@mail.ru

Химическое загрязнение производственной среды неизбежно порождает вопросы о том, в какой степени организм человека может противостоять возрастающим химическим нагрузкам, каковы при этом его потенциальные возможности и какими внутриклеточными механизмами обеспечивается устойчивость организма к действию химических веществ.

Явление адаптации к действию химических веществ имеет давнюю историю в отечественной науке и связано с именем заслуженного деятеля науки РФ, профессора Н.В. Лазарева. Именно Н.В. Лазареву и его коллегам принадлежит открытие удивительного феномена - состояния неспецифически повышенной сопротивляемости (СНПС) [7].

Знание механизмов адаптации к воздействию токсичных веществ необходимо для решения важных прикладных задач, а именно, концепция адаптации дает реальные предпосылки:

- 1) для разработки методов объективной оценки способности организма к адаптации в заданных (конкретных) условиях окружающей среды;
- 2) для разработки способов диагностики ранних признаков интоксикации;
- 3) для изыскания новых средств, повышающих способность к адаптации;
- 4) для оценки реальных размеров опасности (риска) для здоровья человека и величины научного обоснования гигиенического регламента.

Рассматривая процесс интоксикации как взаимодействие яда и организма, его можно условно разделить на несколько этапов: 1) развитие комплекса первичных реакций организма на внедрение ксенобиотика и транспортировка его до точек (мишеней) взаимодействия; 2) развитие реакций организма, обусловленных специфическим и побочным взаимодействиями химического агента с биологическими субстратами организма (ферментами, медиаторами, мембранными образованиями и т.д.); 3) формирование структурно-функциональных патологических изменений тканей в результате недостаточности первичных адаптационных реакций; 4) восстановление или развитие повреждений структуры и функции тканей, органов и систем организма. Каждому из этих этапов соответствует определенный комплекс генетически обусловленных специфических и общих защитных реакций. Поэтому вполне естественно, что при любой степени интоксикации развитие адаптационных реакций в организме идет по двум основным направлениям: собственно детоксикация ксенобиотиков – окисление, связывание, выведение и одновременно изыскание резервов по

обеспечению энергией этих процессов для компенсации возникающего энергодефицита. Наиболее эффективные механизмы адаптации организма, включаемые сразу после попадания в его внутренние среды ксенобиотиков, реализуются через функционирование структурных и биохимических систем, способных обеспечивать быстрое выведение яда из зоны его возможного действия и организма в целом. Первым доказательством такого механизма является то обстоятельство, что с повышением дозы ксенобиотика скорость его выведения из организма почти линейно возрастает [14,13].

Другим важным механизмом адаптации, ответственным за детоксикацию и выведение ксенобиотика, является процесс метаболизма [6,8]. При этом показано, что скорость метаболизма, судя по скорости выведения метаболитов с мочой, возрастает с увеличением дозы. Однако это происходит до определенной величины вводимой дозы, после которой наступает процесс торможения.

Биотрансформация ксенобиотиков является многоступенчатым процессом, в котором одновременно или поочередно участвуют многие ферменты детоксикации (монооксигеназы, трансферазы, гидролазы и др.). Известные реакции и ферментные системы, осуществляющие метаболизм, условно разделяются на два типа [8,1]. Один тип биотрансформации ядов объединяет молекулярные механизмы, локализованные в цитозоле, митохондриях, пероксисомах и лизосомах. Эти механизмы реализуются преимущественно при попадании в организм водорастворимых соединений. Другой тип метаболизма включает молекулярные механизмы, связанные с функцией монооксигеназных систем, локализованных на мембранах эндоплазматического ретикулаума, где осуществляются две фазы детоксикации липофильных ксенобиотиков. Первая фаза заканчивается образованием метаболитов, содержащих нуклеофильные группы, которые биологически более активны, чем исходная молекула. Одновременно эти реакционноспособные продукты биотрансформации подвергаются второй фазе детоксикации – процессу конъюгации. Реализуемые как единый, четко скоординированный комплекс, обе эти фазы приводят к увеличению гидрофильности, снижению биологической активности и токсичности молекул и легко удаляются из организма. Кроме того, есть вещества, которые в зависимости от попавшей в организм дозы могут метаболизироваться как цитозольными ферментами, так и системой монооксигеназ [5, 9].

Биохимическими компонентами системы, осуществляющими первую фазу детоксикации, являются: цитохром Р-450, ответственный за активацию кислорода и связывание субстрата; НАДФ•Н-цитохром-Р-450-редуктаза; цитохром b5 и НАДН-цитохром-b5-редуктаза [2], а также НАДФ•Н-флавинозависимые монооксигеназы и НАДФ•Н-флавино-редуктаза. Отметим, что к настоящему времени система цитохром Р-450 (СYP) имеет более 1000 изоформ – изоферментов. Все изоформы

цитохрома P450 объединены в семейства CYP: CYP1, CYP2, CYP3 и т.д. Результаты работ по расшифровке нуклеотидных последовательностей генома человека позволяют предположить, что их число значительно больше.

Прямое отношение к метаболизму лекарств и ксенобиотиков имеют шесть цитохромов P450 (CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4), которые катализируют 90% всех реакций окисления токсикантов.

В организме существует система регуляции скорости реакций ферментных систем эндоплазматического ретикулума. В первую очередь, что очень важно, в качестве регуляторов активности гидроксилаз могут выступать сами ксенобиотики [5]. Если в обычных условиях микросомы содержат в функционально активном состоянии лишь около 5% всего цитохрома P-450, то по мере поступления в организм химического вещества-субстрата количество цитохрома P-450 и его активность повышается, возрастает содержание в организме так называемого субстрат-связывающего белка, а также увеличивается активность НАДФ•Н-цитохром-P-450-редуктазы [9], что и обеспечивает в целом высокую скорость метаболизма. При этом в зависимости от химической природы ксенобиотика начинается синтез соответствующих изоформ этого фермента [4]. Безусловно, повышение устойчивости организма к повреждающему действию ксенобиотиков обеспечивается значительной перестройкой внутриклеточных биоэнергетических механизмов.

При хроническом поступлении ксенобиотиков в дозах и концентрациях значительно ниже средне смертельных и, особенно в концентрациях, близких к пороговым, адаптационные возможности организма реализуются с большей эффективностью. При этом клетка, обладая запасом энергии и временем для защиты от вредного действия, способна реализовать наиболее выгодные и оптимальные пути и механизмы своего функционирования. Проведенные в нашей лаборатории эксперименты с ингаляционной заправкой животных различными химическими веществами показали, что ингибирующий эффект исследуемых соединений на микросомальное окисление достигал максимального значения практически в течение первого месяца воздействия. Затем на фоне дальнейшего воздействия постоянных концентраций веществ активность микросомальных монооксигеназ постепенно восстанавливалась и к окончанию воздействия вредного фактора возвращалась к уровню контроля. Высота максимума и время достижения ингибирующего эффекта зависят от исходной концентрации ксенобиотика, субстратной специфичности к цитохрому P-450 и скорости микросомального окисления. Общая форма динамической кривой активности микросомальных монооксигеназ при ингаляционном поступлении ядов с различными физико-химическими и биологическими свойствами еще раз свидетельствует о том, что причиной такого

неспецифического характера токсикодинамики являются не токсические свойства ксенобиотиков, а генетически обусловленные механизмы самого организма, обеспечивающие определенный уровень его функционирования в реальных условиях окружающей среды. Важно отметить, что характер динамики микросомального окисления идентичен токсикодинамике показателей функции других органов и систем, особенно тех, которые непосредственно связаны с детоксикацией и выведением ксенобиотиков, в частности, системы глутатиона и почек. Выявленные обстоятельства еще раз подтверждают мнение о том, что монооксигеназный аппарат эндоплазматического ретикулума входит в единую систему защиты организма от воздействия вредного фактора химической природы как ее ведущее звено [11].

Однако было бы неправильным принимать явление адаптации организма как процессы безболезненные, тем более что они не всегда являются абсолютно целесообразными [12]. В этом отношении особую опасность представляют экстремальные воздействия химического агента, а также хроническое поступление ядов в организм в концентрациях или дозах, значительно (на порядок и более) превышающих пороговые.

Экстремальное воздействие химических веществ вызывает одновременное повреждение цитохрома Р-450 и системы ферментов, обеспечивающих создание энергетического резерва организма. При этом причинами энергодефицита могут быть неспецифические поражения мембран митохондрий, а также сам процесс детоксикации, вызывающий истощение фонда НАДФ, гликогена, аскорбиновой кислоты и восстановленного глутатиона. Свидетельством этого является обнаруженное угнетение детоксицирующей функции печени, как правило, сопровождающееся признаками энергодефицита: дистрофические изменения в печени и почках, угнетение активности сукцинатдегидрогеназы, выраженный сдвиг тиол-дисульфидного равновесия в сторону повышения окисленных форм низкомолекулярных тиолов.

Примером такого опосредованного ингибирования цитохром-Р-450-зависимых монооксигеназ является действие исследованного нами диметиламинопропионитрила. Полученные результаты свидетельствуют о том, что при острой интоксикации этим веществом, вызывающим угнетение цитохромоксидазы, отщепляющейся нитрильной группой, энергоснабжение организма осуществляется главным образом за счет гликолиза, который быстро приводит к истощению запасов гликогена – источника энергии, обеспечивающего восстановление ферментов микросом и системы глутатиона.

Другим примером, когда причиной срыва адаптационных механизмов является нарушение взаимодействия процессов энергетического и микросомального окисления, может быть острое отравление трихлорэтиленом. Согласно нашим и литературным данным,

механизм нарушения процесса энергообразования при действии трихлорэтилена, как и других хлорированных углеводов, связан, с одной стороны, с их мембранным эффектом, а с другой — со значительными расходами источников энергии (НАДН, НАДФ) на процессы детоксикации.

Обнаруженное нами увеличение содержания катехоламинов (норадреналина) в сердечной мышце можно рассматривать как типичную физиологическую реакцию на токсический стресс, обусловленную недостатком энергии. Известно, что дефицит энергетических запасов при различных экстремальных нагрузках на организм является сигналом включения гликолиза, существенную роль в активации которого играют катехоламины [3]. Однако, если в условиях физической нагрузки адаптационная реакция организма — активация гликолиза способствует накоплению субстратов для перехода на более эффективную работу митохондрий, связанную с окислением янтарной кислоты, то на фоне воздействия химических веществ, таких как трихлорэтилен, этот адаптационный механизм становится фактором, усугубляющим тяжесть патологического процесса. Выброс катехоламинов, стимулируя гликолиз и ингибируя синтез гликогена из уридиндифосфатглюкозы, приводит к истощению запасов углеводного резерва клеток и, как следствие, снижению активности детоксицирующих ферментов.

Важным показателем, подтверждающим снижение энергетического уровня внутриклеточного потенциала под действием ксенобиотиков (на примере диметилцианэтилпропандиамина и N-β-(цианоэтил)диэтилентриамина), является адаптационная перестройка организма отравленных животных по гиперпластическому типу. Так, при интоксикации диметилцианэтилпропандиамином и N-β-(цианоэтил)диэтилентриаминам в костном мозге подопытных крыс наблюдалось статистически значимое увеличение гемоцитобластов, некоторых клеточных популяций эритроидного ростка, а также количества митозов клеток миелоидного ряда. При поступлении в организм исследованных нами ряда ксенобиотиков в периферической крови достоверно повышалось относительное количество лимфоцитов и развивался нейтрофилез (сдвиг формулы влево) с активацией в нейтрофилах щелочной фосфатазы [10].

Хорошо известно, что при активации реакций микросомального гидроксирования, как и ряда других окислительных процессов в аэробных клетках, наряду с возрастанием концентрации активных промежуточных метаболитов, усиливается генерация активных форм кислорода — супероксид-радикала ($O_2^{\cdot-}$), пероксида водорода, синглетного кислорода (1O_2). Эти формы кислорода, если они не успевают разрушиться под действием соответствующих ферментов, могут вызвать образование высокореакционного гидроксильного радикала $\cdot OH$, ферментная защита против которого практически отсутствует [2].

Несмотря на имеющуюся в организме мощную систему ферментов (супероксиддисмутаза, каталаза, пероксидаза), способную разрушить свободные радикалы [2], надежность ее, как и любой сложной системы, имеет ограничения. Вероятность нарушений в организме, обусловленных увеличением концентрации свободных радикалов, по-видимому, пропорциональна интенсивности их генерации, т.е. скорости окисления субстратов, в том числе ксенобиотиков, и обратно пропорциональна активности супероксиддисмутазы.

Существенную роль в развитии устойчивости или повышенной чувствительности (риска) к действию ксенобиотиков играет генетически детерминированная индивидуальная чувствительность организма к воздействию факторов окружающей среды. В настоящее время установлена роль ряда полиморфных локусов, участвующих прямо или опосредованно в биотрансформации ксенобиотиков.

Сюда относятся гены семейства цитохромов и, прежде всего, цитохром Р-450 (ген CYP1A1), контролирующие первую фазу детоксикации, а также генов N-ацетилтрансферазы 2 (NAT2) и глутатион-S-трансферазы M1 (GSTM1), ответственных за нормальное функционирование второй фазы детоксикации и нейтрализацию поступающих в организм ксенобиотиков путем ацетилирования или связывания с глутатионом. В зависимости от особенностей генома различные индивидуумы могут сохранять устойчивость или, наоборот, проявлять повышенную чувствительность к повреждающим агентам, и любые отклонения в функционировании системы детоксикации ксенобиотиков, обусловленные нарушением сопряженных ферментативных реакций первой и второй фаз, могут приводить к вредным последствиям для организма [3].

Информация об индивидуальной предрасположенности, связанной с генетическим полиморфизмом ферментов биотрансформации, может рассматриваться в качестве маркера чувствительности человека к воздействию вредных факторов окружающей среды, в том числе к условиям труда. Это позволяет проводить целенаправленный отбор наиболее устойчивого профессионального контингента для работы в конкретных условиях химического производства, выделять среди населения и работающих наиболее уязвимые группы, а также осуществлять специфические профилактические мероприятия для поддержки в группах повышенного риска состояния адаптивности.

При существующем понимании интоксикации как патологического состояния, вызванного общим действием на организм токсичных веществ эндогенного или экзогенного происхождения, вряд ли можно согласиться с бытующим представлением об адаптации как фазе интоксикации. Безусловно, адаптация есть первый признак контакта яда с организмом, но она не является детерминирующей причиной развития патологии, которая наблюдается только в случае, если скорость или объем поступления яда

превышают приспособительные возможности организма. При любых обстоятельствах клиническая оценка приспособительных функций и реакций как достаточных или недостаточных не меняет их биологической, т.е. адаптационной сущности [4].

Литература

1. Арчаков А.И. Микросомальное окисление. – М.: Наука, 1975. – 326 с.
2. Баранов В.С., Баранова Е.В., Иващенко Т.Э., Асеев М.В. Геном человека и гены «предрасположенности» (введение в предиктивную медицину). – СПб.: Интермедика, 2000. – 272 с.
3. Гуляева Л.Ф., Вавилин В.А., Ляхович В.В. Ферменты биотрансформации ксенобиотиков в химическом канцерогенезе. Аналитический обзор. – Новосибирск, 2000. – 85 с.
4. Давыдовский И.В. Приспособительные процессы в патологии. (Медико-биологический аспект проблемы) // Вестник АМН СССР. – 1962. – № 4. – С. 27–37.
5. Кобляков В.А., Коляда А.Ю. Некоторые канцероген-метаболизирующие ферменты (НАДФН-цитохром и опухоли) // Итоги науки и техники. ВИНТИ. Онкология. – М., 1986. – Вып. 15. – С. 175–221.
6. Кулинский В.И. Обезвреживание ксенобиотиков // Соросовский образовательный журнал. – 1999. – №1. – С. 8–12.
7. Люблина Е.И., Минкина Н.А., Рылова М.Л. Адаптация к промышленным ядам как фаза интоксикации. – Л.: Медицина, 1971. – 205 с.
8. Метелица Д.И., Попова Е.М. Механизмы окисления алифатических спиртов ферментными системами печени // Биохимия. – 1979. – Т.44., Вып. 11. – С. 1023–1035.
9. Мишин В.М., Ляхович В.В. Множественные формы цитохрома Р-450. – Новосибирск: Наука, 1985. – 181с.
10. Саркисов Д.С. (ред.) Структурные основы адаптации и компенсации нарушенных функций: Руководство. – М.: Медицина, 1987. – 448 с.
11. Сидорин Г.И. К вопросу о биохимической адаптации при экстремальном и хроническом действии промышленных ядов//Современные проблемы профилактической токсикологии. – М., 1991. – С. 4–25.
12. Сидорин Г.И., Луковникова Л.В. Исследование метаболизирующих систем в решении проблемы гигиенического регламентирования//Актуальные проблемы теоретической и прикладной токсикологии. – М., 1988. – С. 11–27.
13. Тиунов Л.А. Биохимические механизмы адаптации и компенсации нарушенных функций при действии на организм химических веществ // Структурные основы адаптации и компенсации нарушенных функций. –

М.: Медицина, 1987. – С. 366–381.

14. Brancaccio A., Mazza V., Di Paolo R. La funzionalita benale nell'intossicazione sperimentale da tetrachloretilene // Folia Med. – 1971. – V. 54, N 10-11. – P. 233–237.

15. Fridovich J. The biology of oxygen radicals // Science. – 1978. – V. 20. – P. 875–880.

**СРАВНИТЕЛЬНОЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
ГЕНОТОКСИЧЕСКОГО И ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ
НИТРОЗОДИМЕТИЛАМИНА В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОГО
ВВЕДЕНИЯ В СУБТОКСИЧЕСКИХ ДОЗАХ С ПОМОЩЬЮ
МИКРОЯДЕРНОГО ТЕСТА НА РЕТИКУЛОЦИТАХ И НА
КУЛЬТУРЕ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БЕЛЫХ
КРЫС**

Н.В. Томилин, О.А. Филько, А.В. Храброва, Н.Е. Соловьева,
В.А. Утсаль, К.А. Краснов

ФГБУН ИТ ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Nikolay_Tomilin@rambler.ru

Генотоксическое и цитотоксическое действие нитрозодиметиламина (НДМА) исследовали с помощью микроядерных тестов на ретикулоцитах и на культуре лимфоцитов с цитокинетическим блоком. НДМА вводили внутрибрюшинно самцам белых крыс в дозах 3,5 и 7 мг/кг. Кровь забирали из хвостовой вены через 7 и 14 суток после ежедневного введения НДМА. Генотоксическое действие НДМА оценивали по относительному содержанию ретикулоцитов с микроядрами после анализа 2000 клеток и частоте встречаемости двуядерных лимфоцитов с микроядрами после анализа 1000 двуядерных клеток, а цитотоксическое – по общему содержанию ретикулоцитов в 1 мл крови и относительному содержанию двуядерных лимфоцитов по отношению к общему количеству одно-, двух-, трех- и четырехядерных клеток в культуре.

Статистический анализ выполняли с помощью методов параметрической и непараметрической статистики. Достоверность различий относительного содержания ретикулоцитов и двуядерных лимфоцитов с микроядрами в контрольных и экспериментальных группах оценивали с помощью непараметрического одностороннего теста Манн-Уитни. Наличие дозозависимого действия устанавливали с помощью критерия Джонкхиера-Терпстры.

Сравнение относительной плотности двуядерных лимфоцитов и содержание ретикулоцитов в 1 мл крови в экспериментальных группах относительно контрольных групп осуществляли с помощью критерия Даннета. Проверка зависимости эффекта от величины дозы проверяли с помощью критерия линейного тренда.

Было показано, что через 7 суток после ежедневного введения НДМА генотоксическое действие на ретикулоцитах отсутствует: в

контроле относительное содержание ретикулоцитов с микроядрами составило $0,012 \pm 0,003\%$, а в экспериментальных группах – $3,5 \text{ мг/кг} - 0,023 \pm 0,008$ и $7 \text{ мг/кг} - 0,013 \pm 0,003\%$. Цитотоксическое действие НДМА выразилось в дозозависимом снижении содержания ретикулоцитов: в контроле – $3,2 \pm 0,4 \times 10^8$, а в экспериментальных группах при $3,5 \text{ мг/кг} - 2,1 \pm 0,2 \times 10^8$ * и $7 \text{ мг/кг} - 1,2 \pm 0,1 \times 10^8$ * в 1мл крови (*– $p < 0,05$, критерий Даннета).

Спустя 14 суток генотоксическое действие на ретикулоцитах также установлено не было: в контроле относительное содержание ретикулоцитов с микроядрами составило $0,011 \pm 0,002\%$, а в экспериментальных группах при $3,5 \text{ мг/кг} - 0,016 \pm 0,002 \%$ и при $7 \text{ мг/кг} - 0,012 \pm 0,004\%$. Цитотоксическое действие НДМА также имело дозозависимый характер: содержание ретикулоцитов составило в контроле – $1,8 \pm 0,1 \times 10^8$, а в экспериментальных группах при $3,5 \text{ мг/кг} - 1,2 \pm 0,2 \times 10^8$ и $7 \text{ мг/кг} - 1,1 \pm 0,1 \times 10^8$ в 1 мл крови* (*– $p < 0,05$, критерий Даннета).

В исследованиях с помощью культуры лимфоцитов с цитохалазиновым блоком через 7 суток после ежедневного введения НДМА было выявлено дозозависимое генотоксическое действие НДМА. Частота встречаемости микроядер в двуядерных лимфоцитах составила в контроле $0,63 \pm 0,06\%$, в экспериментальных группах $3,5 \text{ мг/кг} - 0,70 \pm 0,20\%$ и $7 \text{ мг/кг} - 0,89 \pm 0,09\%*$ (*– $p < 0,05$, критерий Манн-Уитни). Цитотоксическое действие НДМА имело дозозависимый характер: относительное содержание двуядерных лимфоцитов составило в контроле – $45,6 \pm 1,3 \%$, а в экспериментальных группах при $3,5 \text{ мг/кг} - 44,7 \pm 1,9\%$ и $7 \text{ мг/кг} - 38,8 \pm 1,1\%*$ (*– $p < 0,05$, критерий Даннета).

Спустя 14 суток после ежедневного введения НДМА также было получено дозозависимое генотоксическое действие НДМА. Относительное содержание микроядер в двуядерных лимфоцитах составило в контроле – $0,48 \pm 0,05\%$, в экспериментальных группах $3,5 \text{ мг/кг} - 0,89 \pm 0,18\%$ и $7 \text{ мг/кг} - 1,49 \pm 0,50\%*$ (*– $p < 0,05$, критерий Манн-Уитни). Цитотоксическое действие НДМА также сохраняло дозозависимый характер: относительное содержание двуядерных лимфоцитов в контроле – $45,1 \pm 2,6\%$, а в экспериментальных группах при $3,5 \text{ мг/кг} - 37,8 \pm 2,8\%$ и $7 \text{ мг/кг} - 32,6 \pm 2,0\%*$ (*– $p < 0,05$, критерий Даннета).

Результаты сравнительного исследования двух микроядерных тестов продемонстрировали, что микроядерный тест на ретикулоцитах не выявил генотоксического действия НДМА, по-видимому, из-за его маскирующего цитотоксического действия в условиях хронического введения в дозах $3,5$ и 7 мг/кг в течение 7 и 14 суток.

Микроядерный тест на лимфоцитах в культуре с цитокинетическим блоком обнаружил дозозависимые генотоксическое и цитотоксическое действия НДМА в условиях хронического введения в дозах $3,5$ и 7 мг/кг в течение 7 и 14 суток.

Таким образом, результаты исследования при определении генотоксического действия НДМА с помощью микроядерного теста на лимфоцитах в культуре с цитокинетическим блоком продемонстрировали более высокую чувствительность, надежность и независимость от цитотоксического эффекта по сравнению с микроядерным тестом на ретикулоцитах.

СИСТЕМА БИОТЕСТИРОВАНИЯ ОПАСНЫХ ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ В ОПЫТАХ IN VITRO

Е.Б. Туржова

*ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия
gpesh@fmbamail.ru*

Введение. Существенным фактором риска для здоровья населения является загрязнение среды обитания, при этом содержание химических веществ в окружающей среде даже на уровнях, не вызывающих выраженных токсических эффектов отдельных агентов, может оказывать комбинированное их действие, способное влиять на здоровье граждан и состояние окружающей среды.

Использование методов биотестирования с помощью тест-объектов представляет перспективное направление скрининга влияния разнообразных химических соединений, в том числе опасных химических веществ (ОХВ), являющихся химическими загрязнителями производственной и окружающей среды при ракетно-космической деятельности, уничтожении химического оружия и работах на других химически опасных объектах (ХОО), на живые организмы [2, 4].

В России разработано свыше 40 методов биотестирования. Предложено более 100 организмов различных таксономических групп. Высококочувствительные организмы в качестве тест-объекта фактически используется как аналитический прибор, отвечающий требованиям доступности, простоты оперативного выполнения большого массива анализов по определению спектра лимитирующих показателей, силы и характера биологического действия исследуемых веществ, уровней порога действия в опытах *in vitro*, классов опасности и других санитарно-экологических показателей [3].

Целью настоящего исследования явилась разработка системы биотестирования в опытах *in vitro* для экспресс-оценки потенциальной опасности воздействия опасных химических веществ, получаемых и используемых на объектах ракетно-космической отрасли, а также химических загрязнителей производственной и окружающей среды при уничтожении химического оружия и других видах деятельности.

Материалы и методы, результаты исследований.

Проведен анализ и систематизация многолетних экспериментальных исследований методами биотестирования в опытах *in vitro* на моделях 1 порядка, используемых для ускоренной

токсикологической оценки и прогнозирования гигиенических нормативов, а также на гидробионтах и других биомоделях 2 порядка, применяемых в экотоксикологии [4].

Для биотестирования флуоресцирующих тест-объектов (бактерий, хлорелла, пиридиннуклеотиды, рибофлавин, люцифераза) разработаны способы биотестирования и многофункциональный прибор «Биотестер», защищенный патентом (Патент РФ RU 2078 U 11).

С целью выявления взаимосвязей между результатами биотестирования в опытах *in vitro* и *in vivo* для различных химических веществ проведены исследования и на животных с использованием общепринятых традиционные методов предварительной токсикологической оценки при в/ж введении в дозах на уровне $1 \cdot 10^{-4}$ моль/кг при однократном и 10-кратном введении. Проведен корреляционный анализ полученных результатов.

В развитие предварительной оценки токсичности новых химических соединений, внедренной А.О. Лойтом и соавт. под руководством С.Д. Заугольников (70-80 годы XX века), начиная с 90-х годов XX столетия в ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России для токсикологической экспресс-оценки химических агентов экспериментально обоснованы принципы формирования тест-систем; проведен скрининг тест-объектов; выбор показателей и критериев оценки токсичности опасных химических веществ; методов их определения; осуществлена модификация и адаптация способов биотестирования в опытах *in vitro*, альтернативных традиционным методам на лабораторных животных. Эти подходы особенно важны для ускорения предварительной оценки вновь синтезированных химических соединений, оперативности выявления опасности вредного действия на человека и биоту отдельных токсикантов, а также комплекса веществ неизвестного состава в объектах окружающей среды. Разработанная концепция экспресс-оценки химических агентов методами биотестирования в опытах *in vitro* включает следующие положения:

1. Комплексность токсикологических исследований на основе использования биомоделей двух типов – 1 порядка (млекопитающие и человек) и 2 порядка (гидробионты, бактерии, культуры клеток и др.) из четырех известных моделей (кроме первых двух также 3 порядка – математическая модель на основе моделей 1 и 2 порядка и 4 порядка – математические конструкции субмолекулярного уровня иерархии [3]) и трех уровней структурной организации (субклеточный, клеточный и организменный).

2. Алгоритм экспресс-оценки химических агентов с применением методов биотестирования в опытах *in vitro*, необходимый для унификации приемов исследования как отдельных веществ, так и смесей неопределенного состава.

3. Скрининг информативных методов и адекватных

биологических тест-объектов для определения лимитирующих показателей на уровне порогов действия.

4. Систематизация результатов биотестирования в целях разработки классификации (без)опасного действия химических агентов на основе результатов биотестирования в опытах *in vitro*.

Основными областями практического применения методов биотестирования с использованием биологических тест-объектов явились:

- токсикологические исследования на стадии предварительной экспресс-оценки новых химических веществ, определения параметров токсикометрии, изучения механизма действия, ключевых звеньев патогенеза интоксикации ксенобиотиками и т.д.;

- фармакоанализ на стадии разработки и скрининга фармацевтических препаратов, определения биологической активности и токсичности лекарственных средств;

- экологические исследования влияния химического фактора на биоценоз; в том числе экологическая оценка опасности промышленных отходов, продуктов уничтожения химического оружия и др. Биомаркерами антропогенного загрязнения являются естественные компоненты биоценоза и различные тест-объекты.

Исследования воздействия ОХВ на биологические тест-объекты разных уровней структурной организации осуществляются с последующей экстраполяцией на человека. В зависимости от целей и задач при биотестировании в опытах *in vitro* применяют биохимические, генетические, морфологические, физиологические, биофизические и иммунологические методы. Основные группы методов биотестирования токсичности опытах *in vitro* включают:

1. Краткосрочные методы (с использованием моделей 2 порядка, а также применением кофакторов, ферментов, показателей сыворотки крови, показателей липидного, углеводного обменов и других показателей объектов 1 порядка), дающие в опытах *in vitro* предварительную информацию об общетоксическом действии химических агентов.

2. Альтернативные методы, позволяющие в опытах *in vitro* на основании ответной реакции биологических тест-объектов разных уровней организации определить характер токсических эффектов ОХВ.

3. Методы, позволяющие выявить специфические эффекты: генотоксические, терато-, эмбриотоксические, потенциальную мутагенную активность исследуемых веществ (или компонентов), нейро-, гепато-, кардио-, иммунотоксичность и др.

Особую значимость имеют методы экспресс-оценки воздействия высокоопасных химических веществ и их метаболитов на биоценоз в целом.

Сочетанное применение моделей первого и второго порядков может способствовать адекватной оценке опасности химических агентов при определении основного критерия гигиенического нормирования - порогов

чувствительности тест-объектов по лимитирующим показателям.

Эффективность методик биотестирования обосновывается наличием основных составляющих, включающих:

1. Тест-объект, подготовленный для проведения анализа (культуры клеток, микроорганизмов, фрагменты клеток и т.д.).

2. Тест-реакция (функция) – ответная реакция тест-объекта на внешнее воздействие, которую можно количественно оценить или измерить.

3. Измерительная система (прибор), которая дает количественную величину ответной реакции тест-объектов на воздействие.

4. Набор методических приемов, обеспечивающих взаимосвязь всех составляющих компонентов измерительной биотестовой системы (от подготовки тест-объекта к анализу, создания условий для получения количественной характеристики ответной тест-реакции и до ее измерения).

Алгоритм биотестирования в опытах *in vitro* включает следующие направления:

- разработка концепции биотестирования;
- проведение скрининга тест-объектов и формирование «биомоделей»;
- выбор наиболее чувствительных тест-объектов и адекватных методов исследований;
- определение мишеней воздействия и критериальных показателей;
- экспериментальные исследования «модельных» веществ в различных концентрациях;
- выявление зависимости «доза – эффект» с использованием компьютерных технологий;
- установление порогов действия «модельных» веществ в опытах *in vitro* на каждом уровне организации тест-объектов;
- определение уровней безопасного воздействия химических агентов по совокупности порогов действия в опытах *in vitro*;
- выявление корреляционных связей между уровнями безопасного воздействия в опытах *in vitro* и пороговыми значениями хронического действия в экспериментах;
- апробация методологии экспресс-оценки в опытах *in vitro* на новых химических веществах, и других ОХВ в пробах неизвестного состава;
- классификация химических агентов по критериям биотестирования в опытах *in vitro*.

По разработанной единой системе биотестирования в опытах *in vitro* нами исследованы 15 веществ разного типа действия: амино-, нитропроизводные, неполярные и полярные органические соединения (модельные вещества), с известными токсиколого-гигиеническими параметрами, используемые при синтезе компонентов ракетных топлив.

Моделирование воздействия химических веществ проведено на 15

биологических тест-объектах, из которых 10 являются естественными для организма млекопитающих: кофакторы, ферменты, витамины, сыворотка крови, препараты печени, перитонеальные макрофаги (ПМ), митохондрии (МТХ), эритроциты, тромбоциты, культуры клеток зародышей мышей и крыс (КЗМ, КЗК) и др. Использованы 5 тест-объектов 2 порядка: бактерии *Photobacterium phosphoreum*, дрожжи-сахаромицеты *Saccharomyces cerevisiae*, тест-система гидробионов, включающая одноклеточную водоросль *Chlorella vulgaris*, одноклеточных животных *Paramecium caudatum* и рачков *Daphnia magna*. Для биотестирования с использованием люминесцирующих тест-объектов: бактерий, хлореллы, пиридиннуклеотидов (НАД·Н₂), рибофлавина, люциферазы нами разработан многофункциональный прибор «Биотестер» (Патент РФ RU 2078 U 11).

Проведена оценка порога действия ОХВ на молекулярном, клеточном и организменном уровнях. Показана возможность применения лазерной корреляционной спектроскопии (ЛКС) для интегральной оценки влияния химических агентов (КРТ, ОВ и др.) на компоненты сыворотки крови в опытах *in vitro*, что позволяет рекомендовать метод ЛКС для оценки загрязнения объектов окружающей среды.

Использование сыворотки крови в качестве тест-объекта в опытах *in vitro* впервые предоставило возможность определения порога токсического действия как водо-, так и липоидорастворимых химических веществ (Авт. свид. № 453043).

Критериями порога действия модельных веществ явились показатели ферментативной активности аминотрансфераз и щелочной фосфатазы, липопротеидного спектра (β -липопротеиды, общие липиды), а также диеновые конъюгаты (первичные продукты перекисного окисления липидов) – для неполярных органических соединений.

На основании данных критериев определены пороги действия для этих групп веществ ($R^2=0,87$).

Среди тест-объектов клеточного уровня организации для аминок-, нитросоединений наиболее чувствительными оказались: резистентность (термостабильность) мембран эритроцитов, метаболическая активность ПМ.

Однако в ходе проведенных нами исследований показано, что чувствительность МТХ, КЗМ крыс, дрожжей-сахаромицетов оказались на 1-2 порядка ниже, чем вышеуказанных биохимических показателей, что не позволяет использовать эти тест-объекты для определения уровней безопасного воздействия.

Успешность использования системы экспресс-оценки *in vitro* показана нами при исследовании ряда микрокапсулированных веществ (инсектицида тиодана, ряда биологически активных компонентов, модифицированных фармацевтических препаратов и др.). Разработан алгоритм оценки многокомпонентных смесей, проведен скрининг

оптимальных вариантов микрокапсулирования на стадии лабораторного синтеза новых форм химических веществ.

Оценка опасности продуктов уничтожения высокотоксичных агентов, представляющих собой смеси химических веществ непостоянного состава, рассматривается в двух взаимосвязанных аспектах: опасности для человека и опасности для объектов окружающей среды (для биоценоза в целом).

Ввиду потенциального риска водорастворимых продуктов УХО (битумно-солевые массы иприта, люизита и фосфорорганических отравляющих веществ, соответственно БСМ-ИЛ и БСМ-ФОВ) при воздействии экстремальных факторов исследование проведено с использованием системы гидробионтов и ЛКС. БСМ-ИЛ и БСМ-ФОВ оказывали негативное действие на все звенья цепочки гидробионтов, вызывая ингибирование флуоресценции хлореллы, снижение миграционной активности парамеций и выживаемости дафний. Биотестирование на тест-объектах молекулярного, клеточного и организменного уровня структурной организации выявило биологически вредное действие растворов БСМ-ФОВ в концентрациях ниже 0,01% от исходного. Биомаркерами явились рибофлавин, клетки хлореллы и парамеции.

Методом ЛКС показано, что сдвиги ЛК-спектров сыворотки крови при воздействии БСМ-ОВ существенно отличаются от эффектов исходных токсикантов (иприта, люизита, ФОВ). Непосредственное влияние на компоненты сыворотки крови *in vitro* оказывали БСМ-зоман и БСМ-VX, порог действия которых составляет 0,002% (масс%).

Полученные данные свидетельствуют об экологической опасности БСМ-ОВ для окружающей среды и, опосредованно, для человека. По результатам биотестирования на гидробионтах определен 2 класс экологической опасности БСМ-ОВ.

По данным ЛКС, непосредственное воздействие НДМГ (в концентрациях 0,5-5 мг/мл) в опытах *in vitro* вызывало максимальное увеличение до (85÷98%) низкомолекулярных частиц сыворотки крови. В экспериментах на лабораторных животных воздействие НДМГ в дозах на уровне 1/50 и 1/5 ЛД₅₀ также вызывало преимущественное накопление низкомолекулярных частиц за счет снижения на 30-40% средномолекулярных частиц сыворотки крови.

Методом дискриминантного анализа показано, что все исследованные химические агенты вызывали изменения ЛК-спектров, типичные для каждого вещества, при этом установлена прямая корреляция между результатами опытов *in vitro* и ЛК-спектрами сыворотки крови лабораторных животных при воздействии в дозах ниже 1/100 ЛД₅₀ в опытах *in vivo*.

Система экспресс-оценки включает 4 основных класса опасности, а 5 класс рассматривается как экологически безопасный уровень воздействия

химических агентов (промышленных отходов и других экотоксикантов). Отнесение химических агентов к тому или иному классу опасности (безопасности) проводится по совокупности изменений большинства показателей, а наиболее чувствительный тест-объект принимается как специфический биоиндикатор.

На основании систематизации результатов биотестирования, полученных в опытах *in vitro*, разработаны классы опасности химических веществ (таблица).

Таблица – Система экспресс-оценки безопасного воздействия химических агентов по результатам биотестирования в краткосрочных опытах *in vitro*

Показатели	Классы опасности				
	1	2	3	4	5
Модели 1 порядка					
Препараты ферментов	1:10000	1:100 0	1:100	1:10	1:5
Сыворотка крови, титр, С, мг/л	1:10000	1:100 0	1:100	1:10	1:2
	0,001	0,01	0,1	1	10
Титр ЛКС	1:10000	1:100 0	1:100	1:10	1:10
Модели 2 порядка					
Дрожжи, титр С, мг/л	1:1000	1:100	1:50	1:10	1:5
	<0,1	1	10	25	250
Хлорелла, титр, С, мг/л	1:1000	1:100	1:50	1:10	1:5
	<0,01	0,1	1	5	10
Парамеции, титр, С, мг/л	1:1000	1:100	1:20	1:10	1:2
	<0,01	0,1	1,0	10	100
Дафнии TL ₅₀ ч, титр, С, мг/л	< 1 часа	1-24ч	1-2 сут	3-4 сут	> 5 сут
	1:1000	1:200	1:100	1:10	1:5
	<0,05	0,1	1,0	10	30
Класс опасности по ГОСТ 12.1.007.-76	1	2	3	4	-

Заключение. Разработанная система экспресс-оценки химических агентов разной этиологии с использованием методов биотестирования в опытах *in vitro* характеризуется достаточной информативностью, простотой выполнения и общедоступностью методов и тест-объектов в лабораторных условиях, эффективна при поиске новых химических соединений и фармпрепаратов на стадии скрининга, разработки и лабораторного их синтеза, при санитарно-эпидемиологическом контроле

экологической ситуации, в том числе в экстремальных условиях, оперативном принятии управленческих решений по обеспечению химической безопасности.

Практическая значимость разработанной методологии экспресс-оценки *in vitro* состоит в существенном сокращении использования экспериментальных животных, трудоемкости токсикологических исследований и экономической целесообразности.

Литература

1. Каркищенко Н.Н. Концептуальное пространство и топологические структуры биомедицины // Биомедицина. – 2005. – № 1. – С. 5-17.
2. Красовский Г.Н., Егорова Н.А. Проблемы и перспективы использования экспериментальных моделей в профилактической токсикологии // Мат. 3 съезда токсикологов России. – М., 2008. – С. 155-157.
3. Терехова, В.А. Биотестирование как метод определения класса опасности // Экология и промышленность России. – 2003. – С. 27-30.
4. Туржова Е.Б., Николаев А.И., Сачава Е.А. и др. // Токсикология, гигиена, профпатология при работе с опасными химическими веществами: Инф. сб. / Под ред. М.Ф. Киселева, А.С. Радилова. – СПб., 2008. – № 2. – 260 с.

ЭКСТРАПОЛЯЦИЯ ТОКСИКОКИНЕТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ЛЕТУЧИХ ПРОМЫШЛЕННЫХ ЗАГРЯЗНИТЕЛЕЙ И ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИХ ПЕСТИЦИДОВ

А.И. Уколов, П.Н. Сорокоумов, А.С. Радилов
ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия
AntonUkolov@gmail.com

Введение. Фосфорорганические пестициды (ФОП) и летучие промышленные загрязнители (ЛПЗ) являются крупнотоннажными химическими соединениями. В отличие от летучих соединений для которых характерен ингаляционный сценарий экспозиции, сценарий экспозиции пестицидами может быть еще и пероральным и/или чрезкожным [6].

В ходе разработке процедур биомониторинга ФОП и ЛПЗ нами разработаны методики их количественного химического анализа [1, 2, 4], которые затем были апробированы при экспериментальном моделировании интоксикаций, в ходе которого были определены токсикокинетические параметры.

Целью данной работы является поиск способов экстраполяции, или масштабирования, токсикокинетики целевых соединений на человека, так как основной целью биомониторинга является определение химической нагрузки на персонал химических предприятий и население.

Материалы и методы исследования. Для экспериментального

моделирования интоксикаций ФОП и ЛПЗ были использованы две группы кроликов-самцов ($n = 6$) породы шиншилла, полученных из питомника "Рапполово". ФОП вводили внутривенно, ЛПЗ – подкожно, дозы приведены в таблице 2.

Отбор крови осуществляли из краевой вены уха сначала до введения (фоновый контроль), затем через 20-30 мин, 1, 2, 3, 4 и 6 часов, 1, 2, 3, 4 и 6 суток после введения. Мочу кроликов собирали до введения, затем в течение первых 3-6 часов, далее через 1, 2, 3, 5, 7, 14 и 21 сутки.

Результаты и их обсуждение. Для вычисления токсикокинетических параметров, ЛПЗ, как и ФОП, были разделены на четыре категории на основании полученных данных об изменении их концентраций в крови во времени.

Скорости абсорбции диметоата, диазинона и метилпаратиона из желудка в системный кровоток, а также аллилхлорида, акрилонитрила, бутилхлорида, дисульфида углерода, хлорацетонитрила, метакрилонитрила, этилметакрилата, пентахлорэтана и *E*-1,4-дихлор-2-бутена из места подкожной инъекции, настолько высоки, что зарегистрировать максимум на токсикокинетической кривой не представляется возможным, поэтому было принято решение при расчетах пренебречь фазой абсорбции, а вычисление токсикокинетических параметров этой группы соединений производить с использованием модели внутривенного введения (формула 1 или 3).

Вычисление параметров остальных соединений было произведено с учетом фазы абсорбции по уравнению 2 или 4. При моделировании токсикокинетики необходимо учесть тот факт, что часть соединений элиминируется из организма в две фазы, быструю и медленную, поэтому при вычислении токсикокинетических параметров две группы соединений были дополнительно разделены еще на две подгруппы каждая. В результате моделирование токсикокинетики было произведено по одному из четырех уравнений (табл. 1).

Рассмотрим далее известные способы экстраполяции токсикокинетических параметров. Основные стратегии, используемые в настоящее время предусматривают учет различий в весе и площади поверхности кожи. Такие вычисления называются межвидовым аллометрическим масштабированием. В качестве более сложной альтернативы аллометрии используют физиологически обоснованные фармакокинетические модели или масштабирование с использованием экспериментов *in vitro*, например, при изучении печеночного клиренса на микросомальных фракциях печени [9].

Необходимый набор токсикокинетических параметров позволяющий воспроизвести зависимость концентрации ксенобиотика в крови включает: константы элиминации и абсорбции, для соединений со значимым периодом абсорбции, а также начальную или кажущуюся начальную концентрацию.

Таблица 1 – Различные способы моделирования зависимости концентрации веществ в крови от времени

	Без абсорбции	С абсорбцией
Одна фаза элиминации	$C(t) = C_0 e^{-k_\alpha t}$ (1)	$C(t) = C_0 \frac{k_{абс}}{k_{абс} - k_\alpha} (e^{-k_\alpha t} - e^{-k_{абс} t})$ (2)
Две фазы элиминации	$C = C_0 (P_f \times e^{-k_\alpha t} + (100 - P_f) \times e^{-k_\beta t})$ (3)	$C = C_0 (P_f \times e^{-k_\alpha t} + (1 - P_f) \times e^{-k_\beta t} - e^{-k_{абс} t})$ (4)

Примечание: C_0 — кажущаяся начальная концентрация ксенобиотика, нг/мл; P_f — доля длительности быстрой фазы (альфа фазы); k_α — константа элиминации быстрой фазы (альфа фазы) или константа элиминации при однофазном выведении, мин⁻¹; k_β — константа элиминации медленной (бета фазы), мин⁻¹; $k_{абс}$ — константа абсорбции, мин⁻¹

Результаты вычисления параметров приведены в таблице 2.

Таблица 2 — Экспериментальные токсикокинетические параметры ЛПЗ и ФОП

Соединение, доза	C_0 , нг/мл	$k_{абс}$, мин ⁻¹	Pf	k_α , мин ⁻¹	k_β , мин ⁻¹	AUC _{0-∞} , нг×мин/мл	C_{max} , нг/мл
Две фазы элиминации без абсорбции							
<i>E</i> -1,4-Дихлор-2-бутен, 0.22 мг/кг	979	-	0.27	0.0430	0.0040	52591	650
Диазинон, 15 мг/кг	308	-	0.75	0.0110	0.0017	0.5×10 ⁵	243
Дисульфид углерода, 0.22 мг/кг	178	-	0.60	0.0190	0.0036	17326	150
Метакрилонитрил, 0.22 мг/кг	3140	-	0.28	0.0200	0.0056	143850	2474
Метилпаратион, 40 мг/кг	954	-	0.47	0.0075	0.0024	1.8×10 ⁵	836
Пентахлорэтан, 0.22 мг/кг	43	-	0.67	0.0182	0.0026	7021	36
Одна фаза элиминации без абсорбции							
Аллилхлорид, 0.22 мг/кг	98	-	-	0.022	-	7200	80
Акрилонитрил, 0.22 мг/кг	110	-	-	0.066	-	1326	57
Бутилхлорид, 0.22 мг/кг	77	-	-	0.018	-	8677	63
Диметоат, 40 мг/кг	2×10 ⁵	-	-	0.012	-	13×10 ⁶	1.5×10 ⁵
Хлорацетонитрил, 0.22 мг/кг	211	-	-	0.078	-	2129	97
Этилметакрилат, 0.22 мг/кг	1,4	-	-	0.020	-	901	1.2
Диэтиловый эфир, 0.22 мг/кг	1103	0.096	0.74	0.0050	0.0024	200808	662
Метилакрилат, 0.22 мг/кг	1833	0.044	0.37	0.0230	0.0054	92153	903

Таблица 2. Продолжение

Метилметакрилат, 0.22 мг/кг	6.3	0.06 7	0.63	0.0160	0.0054	441	3.9
Нитробензол, 0.22 мг/кг	573	0.26 0	0.28	0.0054	0.0013	184771	546
Хлорпирифос, 20 мг/кг	92	0.03 7	0.61	0.0014	0.0009	0.9×10 ⁵	78
Одна фаза элиминации с абсорбцией							
2-Нитропропан, 0.22 мг/кг	864	0.066	-	0.0190	-	53961	517
Гексахлорэтан, 0.22 мг/кг	13	0.150	-	0.0140	-	1070	10
Фозалон, 30 мг/кг	19	0.024	-	0.0011	-	15683	17

В случае успешного масштабирования этих параметров возможно оценить период возможного обнаружения маркера токсиканта в крови с использованием известной методики.

В отечественной практике, в руководстве по доклиническим исследованиям [3], приводится формула для масштабирования периода полувыведения ксенобиотиков которая использует соотношение масс тела экспериментального животного и человека:

$$t_{1/2\text{человек}} = t_{1/2\text{животное}} \times \frac{\text{Масса тела}_{\text{человек}}^{0.25}}{\text{Масса тела}_{\text{животное}}} \quad (5)$$

Некоторыми исследователями предпринимаются попытки создания более точных моделей масштабирования кинетических параметров [5] с использованием выборки лекарственных средств [12]. С использованием такого подхода были определены коэффициенты в следующем уравнении:

$$P_{\text{человек}} = a \times P_{\text{животное}}^b \quad (6)$$

где P – это время полувыведения или объем распределения.

Коэффициент детерминации для избранного набора ксенобиотиков составляет 0.737 для времени полувыведения и 0.754 для вычисления объема распределения. Важным отличием организма крыс от человека является удельное содержание жира: в организме человека жира в 3-4 раза больше по отношению к массе тела, чем у крысы. Поэтому логичным способом повышения точности модели (6) является включение в уравнение логарифма коэффициента распределения в системе октанол/вода ($\log P_{o/w}$) [10]:

$$\log t_{1/2(\text{человек})} = a + b \log t_{1/2(\text{животное})} + c \log P_{o/w} \quad (7)$$

Коэффициент детерминации для использованной выборки составляет уже 0.8474. Модель показывает наилучшую точность для веществ с очень высоким $\log P$ (более 6.5). Масштабирование начальной концентрации или кажущейся начальной концентрации (C_0) возможно провести только при условии предварительного масштабирования площади под кинетической кривой "концентрация–время" (от нуля до бесконечности) ($AUC_{0-\infty}$), которая связана с C_0 одним из следующих отношений:

$$AUC_{0 \rightarrow \infty} = \frac{C_0}{k_\alpha} \text{ или } AUC_{0 \rightarrow \infty} = C_0 \frac{k_\alpha + k_\beta}{k_\alpha \times k_\beta} \quad (8 \text{ и } 9)$$

В ряде исследований [12] для масштабирования значения NOAEL были использованы данные о AUC препарата и масштабированный клиренс на человека скорректированный на биодоступность (F):

$$NOAEL = \frac{AUC_{\text{животное}} \times Cl_{\text{человек}}}{F} \quad (10)$$

В работе [11] предложено распространить аллометрическое масштабирование на клиренс, что открывает возможности для масштабирования площади под кривой при равенстве полученных доз.

$$\frac{Cl_{\text{человек}}}{Cl_{\text{животное}}} = \left(\frac{\text{Масса тела}_{\text{человек}}}{\text{Масса тела}_{\text{животное}}} \right)^{0.66} \quad (11)$$

Таким образом, при равенстве доз токсичных соединений для животного и человека можно вывести следующее аллометрическое отношение: $AUC_{\text{человек}} = 1/8 \times AUC_{\text{кролик}}$, при средней массе тела человека 70 кг, а кролика – 3 кг.

В общем виде, порядок действий, предпринимаемых для масштабирования основных токсикокинетических параметров включает:

1. Определение типа кинетического уравнения (внутри- или внесосудистое, одна фаза элиминации или две).

2. Вычисление отношения клиренсов человека и экспериментального животного: 1/8 для кролика, 1/36 для крысы, и, соответственно, отношения площадей под кривыми для одинаковых доз.

3. Масштабирование периода полувыведения для одной или нескольких фаз элиминации.

4. Вычисление периода возможного обнаружения.

В доступной литературе не удалось обнаружить способов масштабирования коэффициента P_f – долевого выражения длительности быстрой фазы в уравнениях 3 и 4. Поэтому нами была проведена оценка, показывающая, что коэффициент P_f в уравнениях начинает оказывать существенное влияние на период возможного обнаружения биомаркера только при значениях, превышающих 0.8, поэтому для соединений с таким соотношением продолжительностей быстрой и медленной фаз элиминации рассматриваемый способ масштабирования плохо применим. А в дальнейшем, для масштабирования токсикокинетики соединений с двумя фазами элиминации мы использовали коэффициент P_f без масштабирования. Для масштабирования константы абсорбции при внутрижелудочном введении авторы [7] рекомендуют использовать следующее соотношение: $k_{\text{абс(чел)}} = k_{\text{абс(крол)}}/a$, где $a = 1.344$.

Для подкожного введения рекомендуют [8] использовать классическое аллометрическое соотношение от массы тела и тогда для кроликов $a = 8$. Мы предлагаем использовать для масштабирования коэффициента абсорбции соотношение кровотока в мышечной ткани кролика и человека, который в среднем у кролика в 2.4 раза интенсивнее чем у человека ($a = 2.4$). Как и в случае коэффициента P_f , в доступной

литературе не удалось обнаружить способов масштабирования константы абсорбции при подкожном введении низкомолекулярных веществ.

Поэтому нами показано, что вклад аллометрического коэффициента масштабирования константы абсорбции в период возможного обнаружения незначителен. Для расчетов мы использовали коэффициент 2.4 при подкожном введении и 1.344 при внутрижелудочном. Результаты масштабирования токсикокинетических параметров для соединения из групп ФОП и ЛПЗ суммированы в таблице 3.

Таблица 3 – Масштабированные токсикокинетические параметры соединений из групп ЛПЗ и ФОП, а также вычисленные периоды возможного обнаружения их маркеров в крови человека с использованием разработанных методик

Химическое соединение	logP _{ow} ¹	Масштабированные токсикокинетические параметры					
		t _{1/2} , ч (α) ²	t _{1/2} , ч (β) ³	C ₀ , нг/мл	k _{абс} , мин ⁻¹	T _{обн} ⁴ (кролик)	T _{обн} ⁴ (человек)
Две фазы элиминации без абсорбции							
E-1,4-Дихлор-2-бутен	2.35 ⁵	1.3	12	303	- ⁸	1 день	12 ч
Диазинон	3.81	3.4	27.0	204	-	3 дня	9 дней
Дисульфид углерода	1.94	4.5	14.1	4	-	2 дня	32 ч
Метакрилонитрил	0.68	2.8	9.3	7	-	1 день	2.2 дня
Метилпаратион	2.86	7.0	20.8	28	-	2 дня	4.1 день
Пентахлорэтан	3.22	2.9	18.3	3	-	1 день	9.5 ч
Одна фаза элиминации без абсорбции							
Акрилонитрил	0.25	0.9	- ⁶	3	-	1 день	1.5 ч
Аллилхлорид	1.93	5.5	-	3	-	1 день	7 ч
Бутилхлорид	2.39	16.0	-	2	-	2 дня	19 ч
Диметоат	0.78	2.6	10.3	1027	-	3 дня	4.3 дня
Хлорацетонитрил	0.95	0.8	-	4	-	1 день	2 ч
Этилметакрилат	1.94	61	-	<1	-	1 день	- ⁷
Две фазы элиминации с абсорбцией							
Диэтиловый эфир	0.89	2.3	4.8	37	0.040	5 дней	3.9 дней
Метилакрилат	0.80	2.1	8.4	102	0.018	2 дня	2.3 дня
Метилметакрилат	1.38	3.0	8.4	<1	0.028	1 день	-
Нитробензол	1.85	9.0	16.0	17	0.108	1 день	2.9 дня
Хлорпирифос	4.96	35.0	45.0	3	0.015	3 дня	4.4 дня
Одна фаза элиминации с абсорбцией							
2-Нитропропан	0.93	3.4	-	26	0.027	1 день	16 ч
Гексахлорэтан	4.14	6.0	-	<1	0.063	1 день	-
Фозалон	4.38	44.0	-	2	0.010	5 дней	18 ч

Примечания: ¹ – логарифм коэффициента распределения в системе октанол/вода; ² – период полувыведения в быстрой фазе; ³ – период полувыведения в медленной фазе; ⁴ – период возможного обнаружения соединения в крови после введения данной дозы с использованием данной методики; ⁵ - Оценка ACD/Labs Percepta Platform - PhysChem Module; ⁶ – медленная фаза выведения отсутствует; ⁷ – невозможно обнаружить факт введения данной дозы с использованием данной методики; ⁸ – вычисление произведено без учета фазы абсорбции.

Предложенный алгоритм масштабирования токсикокинетических параметров возможно применять при условии равенства биодоступности химических соединений для организма животного и человека, а также линейной зависимости площади под токсикокинетической кривой (AUC) при поступлении рассматриваемой дозы.

Масштабированные токсикокинетические параметры позволяют существенно повышать информативность результатов биомониторинга, так как наличие информации о зависимости концентрации биомаркера от времени, то есть о его токсикокинетических параметрах, позволяет оценивать внутреннюю дозу веществ и, в результате, позволяет провести корректирование гигиенических нормативов, с учетом соотношения внешней дозы (концентрации в контактной среде) и внутренней дозы по результатам анализа биологических сред. Полученные результаты являются существенным шагом в разработке методологии обоснования биологических ПДК органических соединений.

Литература

1. Методика измерений массовых концентраций летучих экотоксикантов в биологических пробах методом газовой хромато-масс-спектрометрии. ФГУП «УНИИМ» Свид. № 222.0319/01.00258/2013 от 08.11.2013 г.
2. Методика измерений массовых концентраций фосфорорганических пестицидов методом газовой хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием. ФГУП «УНИИМ» Свид. № 222.0320/01.00258/2013 от 08.11.2013 г.
3. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / Под ред. А.Н. Миронова. – М.: Гриф и К, 2012. – 944 с.
4. Уколов, А.И., Сорокоумов, П.Н., Уколова и др. Определение дихлофоса, диметоата, хлорпирифоса, фозалона, диазинона и метилпаратиона в крови и моче методом газовой хроматографии с тандемным масс-селективным детектированием // Аналитика и контроль. – 2014. – Т. 18. – №3. – С. 280–286.
5. Bachmann K., Pardoe D., White D. Scaling Basic Toxicokinetic. Parameters from Rat to Man // Environ. Health Perspect. – 1996. – V. 104 (4). – P. 400–407.
6. Davis J.E. Minimizing occupational exposure to pesticides: personnel monitoring // Residue Rev. – 1980. – V. 75. – P. 33–50.
7. Hao K. Prediction of Human Pharmacokinetics from Preclinical Information of Rhein, an Antidiabetic Nephropathy Drug, Using a Physiologically Based Pharmacokinetic Model // Basic & Clin. Pharm. & Tox. – 2014. – V. 114. – P. 160–167.
8. Kagan L., Zhao J., Mager D.E. Interspecies Pharmacokinetic Modeling of Subcutaneous Absorption of Rituximab in Mice and Rats // Pharm. Res. – 2014. – V. 12. – P. 3265–3273.

9. Mortensen, B., Nilsen, O.G. Allometric Species Comparison of Toluene and n-Hexane Metabolism: Prediction of Hepatic Clearance in Man from Experiments with Rodent Liver S9 in a Head Space Vial // Equilibration System Pharmacology & Toxicology. – 1998. – V. 82. – P. 183–188.
10. Sarver, J.G. Estimating Xenobiotic Half-Lives in Humans from Rat Data: Influence of log P // Env. Health Persp. – 1997. – V. 105. – N. 11. – P. 1204–1209.
11. Tang, H., Mayersohn, M. Controversies in Allometric Scaling for Predicting Human Drug Clearance: An Historical Problem and Reflections on What Works and What Does Not // Curr. Topics in Med. Chem. — 2011. — V. 11. — P. 340-350.
12. Zou, P. Applications of Human Pharmacokinetic Prediction in First-in-Human Dose Estimation // The AAPS Journal. — 2012. — V. 14. — N. 2. — P.262-281.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ТОКСИЧНОСТЬ ДОВСХОДОВЫХ ГЕРБИЦИДОВ НА ОСНОВЕ КЛОМАЗОНА И ОКСИФЛУОРФЕНА ДЛЯ ЦИАНОБАКТЕРИЙ АНАВАЕНА В ВОДНОЙ СРЕДЕ.

Э.В. Чермашенцева, Л.Г. Дьячкова, Н.А. Чермашенцева

ФГУП «ГосНИИОХТ», Москва

korolkov@gosniiocht.ru

Введение. С развитием промышленности и сельского хозяйства происходит увеличение антропогенного загрязнения поверхностных вод и, соответственно, рост числа эвтрофированных водоёмов [1].

При эвтрофикации часто происходит «цветение» воды, вызываемое массовым развитием сине-зелёных водорослей (цианобактерий), и их доля в биомассе фитопланктона может составлять 90-100% [1, 2].

Это приводит к уменьшению рыбохозяйственной и рекреационной ценности водоёмов, а также понижению качества питьевого водоснабжения.

Ухудшается не только вкус и запах воды – в ней накапливаются метаболиты сине-зелёных водорослей, оказывающие нейро-, гепато- и дерматотоксическое действие [3, 10]. При употреблении такой воды возникает гастроэнтерит, диарея, повреждение печени, абдоминальные и мышечные боли, воспаление слизистых оболочек [9]. Есть данные, что потребление воды, содержащей токсины цианобактерий, приводит к смерти людей [10].

Постоянное употребление воды, содержащей даже небольшие концентрации токсинов сине-зелёных водорослей, представляет серьёзную опасность для здоровья населения, так как это может приводить к развитию рака печени и прямой кишки [9]. Например, максимальная безвредная концентрация такого токсина, как микроцистин, составляет 0,001 мг/л [10], тогда как в месте водозабора г. Казань (Куйбышевское водохранилище) эта концентрация уже превышена и составляет 0,0015 мг/л [8].

Таким образом, поллютанты поверхностных вод могут оказывать не только прямое влияние на здоровье населения, но и опосредованное – через воздействие на рост сине-зелёных водорослей и выделение ими токсинов.

В регионах с интенсивным развитием сельского хозяйства и, соответственно, применением гербицидных препаратов, гербициды могут составлять значительную часть антропогенных загрязнений водной среды: вынос пестицидов с поверхностными стоками может составлять от 5% до 16% от количества, вносимого на поля [7].

Другим источником загрязнения поверхностных вод гербицидами являются городские стоки, так как гербициды применяются в парковом хозяйстве и на городских твёрдых покрытиях в дозировках значительно больших, чем рекомендовано для сельского хозяйства. При этом персистентные и легко растворимые гербициды имеют тенденцию накапливаться в водной среде [6].

В данной работе проводилось определение влияния гербицидов, рекомендованных для довсходового применения: «Акзифор», содержащий оксифлуорфен в концентрации 240 г/л, и «Алгоритм», содержащий кломазон в концентрации 480 г/л, на жизнеспособность цианобактерий. Оксифлуорфен можно отнести к персистентным веществам, а кломазон – к хорошо растворимым [5].

Материалы и методы. В качестве тест-объекта была выбрана сине-зелёная водоросль *Anabaena spiroide*, вызывающая «цветение» воды [5] и выделяющая такие токсины, как микроцистин, сакситоксин, анатоксин-а, анатоксин-а(S) [9].

Культура *Anabaena spiroides* получена из Коллекции культур водорослей лаборатории Микробиологии Биологического института Ленинградского университета (CALU 799, выделена в Краснодарском крае РФ).

Выращивание культуры производилось на среде Гиндака [4] в разведении 1:10 в климатостатах при 28°C и освещённости 4500 люкс 24 часа в сутки. Стартовая плотность культуры составляла 7 тыс/мл. Прирост культуры оценивался путём определения оптической плотности (ОП) на спектрофотометре Specord S 600 (Analytic Jena A.G.) при длине волны 750 нм, а также прямым счётом клеток в камере Горяева на 7-е и 10-е сутки выращивания.

Действие гербицидных препаратов оценивали в троекратной повторности при следующих концентрациях (в пересчёте на количество действующего вещества) в культуральной среде:

- «Акзифор» от 0,0124 мг/мл до 0,037 мг/мл оксифлуорфена;
- «Алгоритм» от 0,05 мг/мл до 0,150 мг/мл кломазона.

Величину токсического действия определяли на основании статистически значимых различий опытных значений ОП культуры по сравнению с контролем.

Результаты и их обсуждение. Результаты измерений ОП после семидневного культивирования представлены на рисунках 1 и 2.

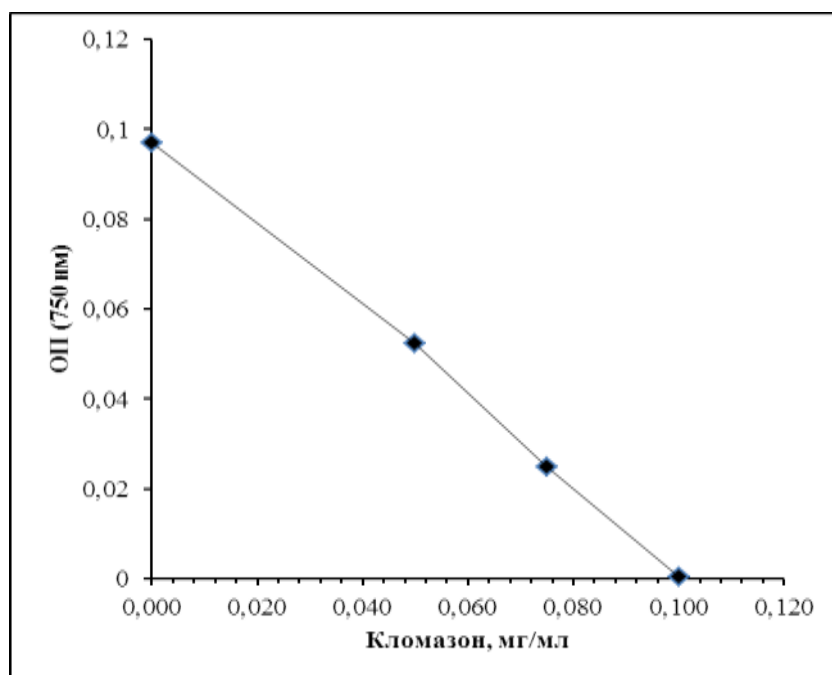


Рис. 1. – Влияние гербицида «Алгоритм» на численность *Anabaena spiroides*.

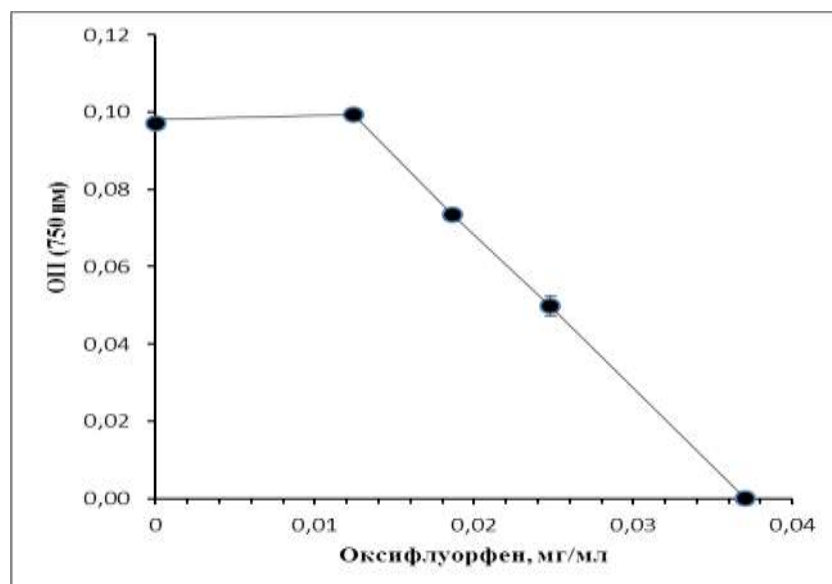


Рис. 2. – Влияние гербицида «Акзифор» на численность *Anabaena spiroides*.

ОП после 7-и суток культивирования обратно пропорциональна количеству токсикантов, при этом EC_{50} для кломазона составляет 0,0528 мг/мл, тогда как оксифлуорфен приблизительно в два раза более токсичен – его EC_{50} составляет 0,0258 мг/мл. Поскольку содержание действующего вещества в препарате «Алгоритм» в два раза больше, чем в

препарате «Акцифор», то можно считать токсичность этих гербицидных препаратов в отношении *Anabaena spiroides* одинаковой.

Устойчивость *Anabaena spiroides* к действию оксифлуорфена и кломазона оказалась очень высокой по сравнению с зелёными водорослями *Scenedesmus quadricauda*, для которых, по нашим данным, ЕС₅₀ при воздействии кломазона составляет менее 0,00015 мг/мл, а при воздействии оксифлуорфена – менее 0,00124 мг/мл.

На 10-й день культивирования культуры *Anabaena spiroides* в присутствии гербицидов величина ОП не пропорциональна количеству токсиканта – отсутствует дозозависимый эффект снижения численности водорослей, отмеченный на 7-е сутки (таблица).

Таблица – Результаты тестирования *Anabaena spiroides* с «Акцифором» и «Алгоритмом» на 7-е и 10-е сутки культивирования

Токсикант/ концентрация (мг/мл)	7 суток культивирования		10 суток культивирования	
	среднее значение ОП/ стандартное отклонение	% от контроля	среднее значение ОП/ стандартное отклонение	% от контроля
Контроль/0	0,0862±0,0094	–	0,1670±0,0142	–
Кломазон/0,05	0,0597±0,077	68%	0,1727±0,0081	103%
Кломазон/0,075	0,0221±0,0037	21%	0,0834±0,0073	50%
Оксифлуорфен /0,0124	0,0869±0,0106	100%	0,1481±0,0199	88%
Оксифлуорфен /0,018	0,0642±0,0084	74,4%	0,1747±0,0173	104,6%
Оксифлуорфен /0,025	0,0328±0,0045	38%	0,1424±0,0096	85%

Как можно видеть, в культуре включаются компенсаторные механизмы, происходит адаптация к сублетальным концентрациям токсикантов настолько, что культуры, рост которых в разной степени был подавлен воздействием токсиканта на 7-е сутки, на 10-е сутки увеличили рост настолько, что компенсировали предшествовавшее подавление роста и в некоторых случаях даже немного превысили значение ОП в контрольных образцах.

Только культура, культивированная с оксифлуорфеном в концентрации 0,012 мг/мл, и на 7-е сутки не испытывавшая подавления роста, к моменту тестирования на 10-е сутки показала небольшое подавление роста, что может быть связано с тем, что при незначительном количестве токсиканта процессы адаптации к нему идут медленнее.

Заключение. Сине-зелёная водоросль *Anabaena spiroides* показала высокую устойчивость к токсическому действию гербицидов на основе оксифлуорфена и кломазона, а также высокую способность к адаптации.

Устойчивость *Anabaena spiroides* к исследованным гербицидам намного превышает устойчивость зелёной водоросли *Scenedesmus quadricauda*. Зелёные водоросли в отличие от сине-зелёных являются ценным кормовым ресурсом в водоёмах и находятся в антагонистических взаимоотношениях с сине-зелёными водорослями, контролируя их численность [2]. Таким образом, попадание даже небольших количеств исследованных гербицидов в водную среду сместит экологическое равновесие, вызвав депрессию зелёных водорослей и массовое развитие сине-зелёных водорослей.

Литература

1. Ашихмина Т.Я., Кутявина Т.И., Домнина У.Ф. Изучение процессов эвтрофикации природных и искусственно созданных водоёмов // Теоретическая и прикладная экология. – 2014. – №3. – С. 6-13.
2. Богданов Н.И. Биологическая реабилитация водоёмов / 3-е изд., перераб. и доп. – Пенза: РИО ПГСХА, 2008. – 123 с.
3. Волошко Л.Н., Пиневиц А.В. Разнообразие токсинов цианобактерий // Астраханский вестник экологического образования. – 2014. – №1(27). – С. 68–80.
4. Гайсина Л.А., Фазлутдинова А.И., Кабиров Р.Р. Современные методы выделения и культивирования водорослей. – Уфа: БГПУ, 2008. – 138 с.
5. Государственный каталог пестицидов и агрохимикатов разрешенных к применению на территории Российской Федерации / – М.: Министерство сельского хозяйства Российской Федерации, 2015. – 507 с.
6. Куликова Н.А., Лебедева Г.Ф. Гербициды и экологические аспекты их применения. – М.: Либроком, 2010. – 126 с.
7. Лунев М.И. Пестициды и охрана агрофитоценозов. – М.: Колос, 1992. – 106 с.
8. Степанова Н.Ю., Халиуллина Л.Ю., Никитин О.В., Латыпова В.З. Структура и токсичность цианобактерий в рекреационных зонах водоёмов Казанского региона // Вода: химия и экология. – 2012. – №11. – С. 67–72.
9. Vláha L., Babica P., Marsalek B. Toxins produced in cyanobacterial water blooms – toxicity and risks // Interdisc. Toxicol. – 2009. – V. 2(2). – P. 36–41.
10. Falconer I.R., Humpage A.R. Health risk assessment of cyanobacterial toxins in drinking water // Int. J. Environ. Res. Public Health. – 2005. – V. 2(1). – P. 43–50.
11. Valerio E., Chaves S., Tenreiro R. Diversity and impact of prokaryotic toxins on aquatic environments // Toxins. – 2010. – V. 2. – P. 2359–2410.

