

ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ ВЕСТНИК

Toxicological Review

Научно-практический журнал

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



№1 (166), 2021

СОДЕРЖАНИЕ

CONTENTS

Х.Х. Хамидулина, Е.В. Тарасова, Е.А. Ринчиндоржиева, А.С. Проскурина, А.Р. Егизарян, И.В. Замкова, Е.В. Дорофеева, С.А. Швыкина, Д.Н. Рабикова, Н.И. Николаева, А.С. Филин, Д.А. Лебедева

АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ РЕГУЛИРОВАНИЯ СОДЕРЖАНИЯ СВИНЦА, КАДМИЯ, РТУТИ И МЫШЬЯКА В ПРОДУКТАХ ПИТАНИЯ..... 2

Е.Г. Трапезникова, В.Б. Попов, А.С. Радиллов, В.В. Шилов
МОРФОМЕТРИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА РЕГЕНЕРАТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ В ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ОСТРОМ ТОКСИЧЕСКОМ ГЕПАТИТЕ И ТРАНСПЛАНТАЦИИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ... 14

К.И. Стосман, К.В. Сивак, Т.А. Рассоха, Т.Н. Саватеева-Любимова
ДОЗЗАВИСИМЫЙ ХАРАКТЕР НАРУШЕНИЯ ФУНКЦИИ КРОВЕТВОРНОЙ И ИММУННОЙ СИСТЕМ, ПРОДУКЦИИ НЕКОТОРЫХ ГОРМОНОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ОТРАВЛЕНИИ УРАНИЛОМ АЦЕТАТОМ ДИГИДРАТОМ..... 20

Е.С. Литвинова, А.И. Конопля, И.М. Холименко, А.Г. Котарь
ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПОСЛЕ КОРРЕКЦИИ АЛЛОГЕННЫМИ ГЕПАТОЦИТАМИ ПРИ ОСТРОМ ТОКСИЧЕСКОМ, ИШЕМИЧЕСКОМ И АЛКОГОЛЬНОМ ПОРАЖЕНИИ ПЕЧЕНИ 27

Э.Т. Гайнуллина, С.Б. Рыжиков, В.Н. Фатеенков, М.А. Понсов, Л.В. Петракова
СПОСОБ НЕИНВАЗИВНОЙ ДИАГНОСТИКИ ПОРАЖЕНИЯ СОЕДИНЕНИЯМИ НЕРВНОПАРАЛИТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОСЕНСОРА В КЛИНИЧЕСКИХ И ПОЛЕВЫХ УСЛОВИЯХ 38

□ **Экологическая токсикология**
А.В. Егорова, Т.Б. Калинникова, Р.Р. Шагидуллин
ТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ МЕДИ, КАДМИЯ И СВИНЦА НА СВОБОДНОЖИВУЩИХ ПОЧВЕННЫХ НЕМАТОД *CAENORHABDITIS ELEGANS* И *CAENORHABDITIS BRIGGSÆ*..... 43

□ **Новые сведения о токсичности и опасности химических и биологических веществ**
А.Ю. Савченко, М.С. Буренков, П.С. Байдин, Г.В. Раменская, В.Г. Кукес
ИССЛЕДОВАНИЕ ОБЩЕТОКСИЧЕСКИХ СВОЙСТВ СУБСТАНЦИИ ПРОТИВУБЕРКУЛЕЗНОГО ПРЕПАРАТА ТИОЗОНИД..... 47

А.А. Спасов, А.Ф. Кучерявенко, Д.В. Мальцев, М.В. Мирошников, В.С. Сиротенко, К.Т. Султанова, К.А. Гайдукова, М.О. Скрипка
ОЦЕНКА ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ НОВОГО ПРОИЗВОДНОГО БЕНЗИМИДАЗОЛА С АНТИТРОМБОГЕННЫМИ СВОЙСТВАМИ 52

□ **Химическая безопасность**
Н.М. Анисимова, В.В. Мустафина, Н.В. Гор
РЕШЕНИЕ ВОПРОСОВ РЕГУЛИРОВАНИЯ ОТХОДОВ, СОДЕРЖАЩИХ СТОЙКИЕ ОРГАНИЧЕСКИЕ ЗАГРЯЗНИТЕЛИ, В РЕСПУБЛИКЕ КАЗАХСТАН 58

□ **Юбилейные даты**
ОСТАПЕНКО ЮРИЙ НИКОЛАЕВИЧ
(К 80-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ)..... 64

Kh.Kh. Khamidulina, E.V. Tarasova, E.A. Rinchindorzhieva, A.S. Proskurina, A.R. Egizaryan, I.V. Zamkova, E.V. Dorofeeva, S.A. Shvykina, D.N. Rabikova, N.I. Nikolaeva, A.S. Filin, D.A. Lebedeva

HIGHLIGHTS OF INTERNATIONAL REGULATION OF LEAD, CADMIUM, MERCURY AND ARSENIC CONTENTS IN FOOD 2

E.G. Trapeznikova, V.B. Popov, A.S. Radilov, V.V. Shilov
MORPHOMETRIC ASSESSMENT OF REGENERATIVE PROCESSES IN THE LIVER OF RATS IN ACUTE TOXIC HEPATITIS AND MESENCHYMAL STEM CELL TRANSPLANTATION 14

K.I. Stosman, K.V. Sivak, T.A. Rassokha, T.N. Savateeva-Lubimova
DOSE-DEPENDENT CHARACTER OF DISTURBANCE OF HEMATOPOIETIC AND IMMUNE SYSTEMS FUNCTION, PRODUCTION OF SOME HORMONES IN EXPERIMENTAL URANIUM ACETATE DIHYDRATE EXPOSURE 20

E.S. Litvinova, A.I. Konoplya, I.M. Kholimenko, A.G. Kotsar
RELATIONSHIP BETWEEN METABOLIC AND IMMUNOLOGICAL INDICATORS AFTER CORRECTION BY ALLOGENIC HEPATOCYTES IN ACUTE TOXIC, ISCHEMIC AND ALCOHOL LIVER INJURY..... 27

E.T. Gainullina, S.B. Ryzhikov, V.N. Fateenkov, M.A. Ponsov, L.V. Petrakova
METHOD OF NON-INVASIVE DIAGNOSTICS OF POISONING BY SUBSTANCES OF NEUROPARALYTIC ACTION WITH THE USE OF A BIOSENSOR IN CLINICAL AND FIELD CONDITIONS..... 38

□ **Ecotoxicology**
A.V. Egorova, T.B. Kalinnikova, R.R. Shagidullin
TOXIC ACTION OF COPPER, CADMIUM AND LEAD ON FREE-LIVING SOIL NEMATODES *CAENORHABDITIS ELEGANS* AND *CAENORHABDITIS BRIGGSÆ* 43

□ **News on toxicity and hazard of chemical and biological substances**
A.Yu. Savchenko, M.S. Burenkov, P.S. Baidin, G.V. Ramenskaya, V.G. Kukes
STUDY OF THE GENERAL TOXIC PROPERTIES OF THE ANTI-TB DRUG THIOSONIDE 47

A.A. Spasov, A.F. Kucheryavenko, D.V. Maltsev, M.V. Miroshnikov, V.S. Sirotenko, K.T. Sultanova, K.A. Gaidukova, M.O. Skripka
ACUTE TOXICITY OF A NEW BENZIMIDAZOLE DERIVATIVE WITH ANTITHROMBOGENIC PROPERTIES 52

□ **Chemical Safety**
N.M. Anisimova, V.V. Mustafina, N.V. Gor
RESOLUTION OF ISSUES OF REGULATION OF WASTE CONTAINING PERSISTENT ORGANIC POLLUTANTS IN THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN 58

□ **Anniversary**
OSTAPENKO YURI NIKOLAEVICH
(TO THE 80TH BIRTHDAY) 64

АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ РЕГУЛИРОВАНИЯ СОДЕРЖАНИЯ СВИНЦА, КАДМИЯ, РТУТИ И МЫШЬЯКА В ПРОДУКТАХ ПИТАНИЯ

Х.Х. Хамидулина^{1,2}, Е.В. Тарасова¹,
Е.А. Ринчиндоржиева¹, А.С. Проскурина^{1,2},
А.Р. Егизарян¹, И.В. Замкова¹, Е.В. Дорофеева¹,
С.А. Швыкина¹, Д.Н. Рабикова^{1,2}, Н.И. Николаева³,
А.С. Филин³, Д.А. Лебедева⁴

¹Федеральное бюджетное учреждение здравоохранения «Российский регистр потенциально опасных химических и биологических веществ» Роспотребнадзора, 121087, г. Москва, Российская Федерация

²Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России, 125993, г. Москва, Российская Федерация

³Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова Минздрава России, 119435, г. Москва, Российская Федерация

⁴Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики», 101000, г. Москва, Российская Федерация

В статье представлен обзор актуальных вопросов международного регулирования содержания тяжелых металлов (свинца, кадмия, ртути и мышьяка) в продуктах питания. Особое внимание уделено пересмотру нормативов содержания мышьяка в рисе, ртути в некоторых видах рыбы, кадмия в шоколаде, свинца в мясе, субпродуктах, вине. Проведен сравнительный анализ нормативов (допустимых уровней содержания) тяжелых металлов в продуктах питания в странах ЕС и Российской Федерации.

Ключевые слова: свинец, кадмий, ртуть, мышьяк, продукты питания, нормирование.

Цит: Х.Х. Хамидулина, Е.В. Тарасова, Е.А. Ринчиндоржиева, А.С. Проскурина, А.Р. Егизарян, И.В. Замкова, Е.В. Дорофеева, С.А. Швыкина, Д.Н. Рабикова, Н.И. Николаева, А.С. Филин, Д.А. Лебедева. Актуальные вопросы регулирования содержания свинца, кадмия, ртути и мышьяка в продуктах питания. Токсикологический вестник. 2021; 1: 2-13.

Введение. Наличие достаточного количества качественных, безопасных и питательных продуктов питания является ключевым фактором не только в поддержании жизни, но и сохранении и укреплении здоровья нации. По оценке ВОЗ,

небезопасные продукты питания, содержащие вредные химические вещества, в том числе тяжелые металлы, вирусы, бактерии, паразитов, могут являться причиной более 200 различных заболеваний от диареи до рака. Ежегодно во всем

Хамидулина Халидя Хизбулаевна (Khamidulina Khalida Khizbulaevna), доктор медицинских наук; директор ФБУЗ РПОХБВ Роспотребнадзора, профессор, заведующий кафедрой гигиены ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, г. Москва, director@rosreg.info;

Тарасова Елена Владимировна (Tarasova Elena Vladimirovna), кандидат химических наук, химик-эксперт ФБУЗ РПОХБВ Роспотребнадзора, г. Москва, secretary@rosreg.info;

Проскурина Ангелина Сергеевна (Proskurina Angelina Sergeevna), врач по санитарно-гигиеническим лабораторным исследованиям ФБУЗ РПОХБВ Роспотребнадзора, ассистент кафедры гигиены ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, г. Москва, proskurina-as@rosreg.info;

Егизарян Анна Рафаеловна (Egizaryan Anna Rafaelovna), кандидат биологических наук; советник директора ФБУЗ РПОХБВ Роспотребнадзора, г. Москва, secretary@rosreg.info;

Замкова Ирина Валентиновна (Zamkova Irina Valentinovna), врач по санитарно-гигиеническим лабораторным исследованиям ФБУЗ РПОХБВ Роспотребнадзора, г. Москва, secretary@rosreg.info;

Дорофеева Екатерина Валентиновна (Dorofeeva Ekaterina Valentinovna), начальник информационно-аналитического отдела ФБУЗ РПОХБВ Роспотребнадзора, г. Москва, secretary@rosreg.info;

Ринчиндоржиева Екатерина Анатольевна (Rinchindorzhieva Ekaterina Anatolievna), врач по санитарно-гигиеническим лабораторным исследованиям ФБУЗ РПОХБВ Роспотребнадзора, г. Москва, secretary@rosreg.info;

Швыкина Светлана Александровна (Shvykina Svetlana Aleksandrovna), начальник организационно-методического отдела ФБУЗ РПОХБВ Роспотребнадзора, г. Москва, secretary@rosreg.info;

Рабикова Динара Нуруллаевна (Rabikova Dinara Nurullaevna), врач по санитарно-гигиеническим лабораторным исследованиям ФБУЗ РПОХБВ Роспотребнадзора, ассистент кафедры гигиены ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, rabikova_dn@rosreg.info;

Николаева Наталья Ивановна (Nikolaeva Natalia Ivanovna), доктор медицинских наук, профессор кафедры экологии человека и гигиены окружающей среды Института общественного здоровья им. Ф.Ф. Эрисмана Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова, г. Москва, nativ.nikolayeva@gmail.com;

Филин Андрей Сергеевич (Filin Andrey Sergeevich), доцент кафедры экологии человека и гигиены окружающей среды Института общественного здоровья им. Ф.Ф. Эрисмана Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова, г. Москва, andrey.filin@mail.ru;

Лебедева Диана Альбертовна (Lebedeva Diana Albertovna), Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики», г. Москва, lebedevady@yandex.ru

мире 600 миллионов человек заболевают в результате употребления некачественной пищи, что приводит к 420000 смертей [1].

В Российской Федерации как и в государствах, входящих в Евразийский экономический союз (Российская Федерация, Беларусь, Армения, Казахстан, Кыргызстан), основополагающим документом, регулирующим качество и безопасность пищевых продуктов, является Технический регламент Таможенного Союза ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции», который устанавливает санитарно-эпидемиологические, гигиенические и ветеринарные требования к пищевой продукции, выпускаемой и находящейся в обращении на рынке ТС [2].

На территории стран Евросоюза качество и безопасность продуктов питания, в том числе допустимые уровни содержания токсикантов, устанавливаются Регламентом ЕС 315/93 и Постановлением Комиссии ЕС 1881/2006 [3,4].

В 1963 году ФАО (Продовольственная и сельскохозяйственная организация Объединенных Наций) совместно с ВОЗ создали межправительственную организацию – Комиссию Кодекс Алиментариус, в состав которой в настоящее время входят 188 стран-членов (включая Российскую Федерацию) и 1 организация-член (Европейский Союз), 237 наблюдателей (58 межправительственных организаций, 163 неправительственные организации и 16 учреждений ООН). Комиссия Кодекс Алиментариус разрабатывает стандарты, руководящие принципы и кодексы практики в области обеспечения качества и безопасности продуктов питания, которые могут быть имплементированы государствами в национальное законодательство [5].

Одним из направлений деятельности Комиссии Кодекс Алиментариус является разработка и/или пересмотр допустимых уровней содержания токсикантов в продуктах питания. В настоящее время на рассмотрении Комиссии находятся следующие вопросы:

- допустимые уровни содержания афлатоксинов и охратоксина в мускатном орехе, специях (чили, паприке, перце, имбире, куркуме);
- допустимые уровни содержания афлатоксинов в зерновых культурах (пшеница, кукуруза, сорго, рис), муке и продуктах питания на основе зерновых культур для младенцев и детей младшего возраста; арахисе;
- допустимые уровни содержания свинца в продуктах питания для младенцев и детей младшего возраста; специях и ароматических травах; яйцах; сахаре и кондитерских изделиях (за исключением какао);
- допустимые уровни содержания метилртути в рыбе;
- допустимые уровни содержания свинца в ви-

не, субпродуктах крупного рогатого скота, свиной, птицы;

- допустимые уровни содержания кадмия в шоколаде и какао-продуктах [6,7,8,9,10,11].

В настоящем обзоре представлен сравнительный анализ регулирования содержания тяжелых металлов (свинца, кадмия, ртути и мышьяка) в продуктах питания в Российской Федерации и странах Евросоюза, а также освещены основные направления деятельности Комиссии Кодекс Алиментариус по данным вопросам.

Ртуть

Наличие металла в окружающей среде обусловлено в основном антропогенными факторами (сжигание угля на угольных электростанциях, использование мусоросжигательных установок, добыча ртути, золота и других металлов и т.д.). В окружающей среде элементарная ртуть трансформируется в метилртуть, которая активно накапливается в рыбах и моллюсках [12].

Отравление ртутью организма человека происходит преимущественно при вдыхании паров элементарной ртути и потреблении в пищу продуктов питания, загрязненных соединениями ртути. При внутрижелудочном пути поступления метилртуть всасывается быстрее и интенсивнее, чем элементарная ртуть, накапливаясь преимущественно в эритроцитах (> 90%). Метилртуть способна проходить через плаценту, гематоэнцефалический барьер, барьер между кровью и спинномозговой жидкостью, проникать в волосяной фолликул. Органы-мишени – почки, печень, нервная, иммунная и репродуктивная системы [13, 14].

В 2017 году на 11-й сессии Комиссии Кодекс Алиментариус по загрязняющим веществам в пищевых продуктах была согласована концепция по определению максимально допустимых уровней (МДУ) содержания метилртути в рыбе [9]:

1. установить максимально допустимый уровень содержания метилртути настолько низким, насколько это возможно с учетом экономических факторов (не более 5% продукции категории «рыба» будет содержать метилртуть в количестве, превышающем установленную величину). Статистические данные по экспорту отдельных видов рыбы (количество / стоимость) используются для оценки значимости конкретного вида рыбы в мировой торговле (табл. 1). Наиболее значимыми являются тунец, марлиновые, удильщик, акула, бериксовые.
2. определять показатель только для тех видов рыб, которые содержат метилртуть в количестве более 0,3 мг/кг по данным мониторинга. Критерий отбора вида рыбы для нормирования – содержание метилртути 0,3 мг/кг – рассчитан из еженедельного объема потребления рыбы (г/человек/неделя),

при котором достигается временный допустимый недельный уровень потребления метилртути 1,6 мкг/кг.

3. для установления корректного значения МДУ необходимо учитывать содержание не только метилртути, но и общей ртути, поскольку в ряде случаев соотношение концентраций метилртуть/общая ртуть очень низкое, что свидетельствует о присутствии других форм ртути в значительном количестве [9].

В 2018 году Комиссия установила следующие максимально допустимые уровни метилртути для тунца (Tuna) на уровне 1,2 мг/кг, берикса (Alfonsino) – 1,5 мг/кг, марлина (Marlin) – 1,7 мг/кг, акулы (Shark) – 1,6 мг/кг. В Таблице 2 представлены данные по содержанию метилртути в тех видах рыб, которые представляют наибольший интерес для Российской Федерации. Анчоусы, карповые, кефаль, полосатая зубатка, лососевые содержат метилртуть в количестве менее 0,3 мг/кг, поэтому разработка нормативов не требуется. В отношении некоторых представителей налимовых, щук, змеиной макрели и сабельщика проводится сбор данных для решения вопроса о необходимости нормирования. В отношении атлантического большеголова и ошибневых Комиссия Кодекс Алиментариус в настоящее время ведет работу по нормированию содержания метилртути, окончательное решение должно быть принято к 2023 году [9].

Стоит отметить, что допустимые уровни содержания токсикантов в продуктах питания, разработанные Комиссией Кодекс Алиментариус, носят рекомендательный характер, и отдельные страны вправе на национальном уровне установить более жесткие нормативы, если они могут обеспечить их выполнение [5, 15].

Так, Регламент Комиссии ЕС 1881/2006 нормирует содержание ртути (не метилртути!) на уровне

не 1,0 мг/кг для тунца, акулы, удильщика, шуки и марлиновых (табл. 3). В Российской Федерации для тунца, меч-рыбы и белуги установлено допустимое содержание ртути на уровне 1,0 мг/кг, для остальных видов рыбы введены еще более жесткие нормативы: 0,3 мг/кг ртути для пресноводной нехищной рыбы, 0,6 мг/кг для пресноводной хищной, 0,5 мг/кг для морской рыбы.

Регламент Комиссии ЕС 1881/2006 не нормирует допустимое содержание ртути в других продуктах питания, поскольку именно рыба является основным «пищевым накопителем» соединений ртути. Для Российской Федерации характерна другая картина: допустимые уровни содержания ртути установлены для широкого круга пищевых продуктов на достаточно низких уровнях, в том числе для мяса, мясных и мясосодержащих продуктов – 0,03 мг/кг, овощей, фруктов и продуктов из них – 0,02 мг/кг, мукомольно-крупяных и хлебобулочных изделий – 0,015 – 0,03 мг/кг [2].

Мышьяк

Мышьяк – ядовитый полуметалл. Мышьяк в низких концентрациях присутствует в горных породах, почве и грунтовых водах.

Мышьяк содержится в различных видах пищевых продуктов, включая зерновые, особенно рис, молоко, фрукты, овощи [16, 17]. В таблице 4 представлены данные по содержанию мышьяка в продуктах питания.

В 2014 году Европейское агентство по безопасности пищевых продуктов (EFSA) опубликовало научный отчет по воздействию неорганических соединений мышьяка на жителей стран Европейского Союза. В период с 2003 по 2012 годы было проанализировано 103773 образца пищевых продуктов, включая питьевую воду, в том числе 101020 проб, содержащих общий мышьяк и 2753 – неорганический. Показано, что 41,9 – 66,1% проб содержали мышьяк в количестве ниже предела

Таблица 1

Экспорт отдельных видов рыбы в 2017 году [9]

Наименование	Научное название	Экспорт, т.	Стоимость, млн. US \$
Тунец	<i>Thunnus</i>	1872517	5018
Марлиновые	<i>Istiophoridae</i>	4753	9
Акула	<i>Selachimorpha</i>	78635	178
Бериксовые	<i>Berycidae</i>	9996*	-
Ошибневые	<i>Ophidiidae</i>	5202	27,5
Атлантический большеголов	<i>Hoplostethus atlanticus</i>	3246	19,3
Удильщик	<i>Lophius sp.</i>	40034	259

*Примечание: указан общий улов.

Таблица 2

Решения Кодекс Алиментариус по отдельным видам рыб [9]

Наименование	Содержание метилртути / общей ртути, мг/кг*	Решение Кодекс Алиментариус (год)
Анчоус <i>Engraulidae sp.</i>	0,05 / 0,07	2019: Норматив не требуется
Удильщик <i>Lophius sp.</i>	0,60 / 0,18	2020: Сбор данных
Карп <i>Cyprinidae</i>	0,03 / 0,13	2019: Норматив не требуется
<i>Odax pullus</i>	-/ 0,02	2019: Норматив не требуется
Щука <i>Escoidea sp.</i>	-/ 0,29	2019: Норматив не требуется Сбор данных – ограниченное географическое распространение
Атлантический большоголов <i>Hoplostethus atlanticus</i>	0,43 / 0,56	2020: Усредненные данные по содержанию метилртути превышают критерий отбора 0,3 мг/кг, разрабатывается МДУ
Кефаль <i>Mugilidae sp.</i>	0,02 / 0,14	2019: Норматив не требуется
Налимовые <i>Lotidae sp.</i>	-/ 0,28	2019: Сбор данных для отдельных представителей
Полосатая зубатка <i>Anarhichas sp.</i>	0,12 / 0,10	2019: Норматив не требуется
Лосось <i>Salmonidae sp.</i>	0,03 / 0,04	2019: Норматив не требуется
Змеиная макрель <i>Gempylidae sp.</i>	-/ 0,39	2020: Сбор данных - отсутствуют данные по метилртути
Сабельщик <i>Trichiuridae sp.</i>	-/ 0,16	2019: Сбор данных - большой разброс данных, ограниченное количество проб, отсутствуют данные по метилртути

Примечание: * Среднее содержание метилртути и общей ртути в различных видах рыб по данным мониторинга.

обнаружения. На основании 28 эпидемиологических исследований, проведенных в 17 странах ЕС, установлено, что дети потребляют с пищевыми продуктами в среднем от 0,20 до 1,37 мкг/кг массы тела мышьяка в сутки, в то время как взрослое население от 0,09 до 0,38 мкг/кг [16].

До 2010 года эксперты ФАО/ВОЗ допускали еженедельное потребление мышьяка в количестве до 15 мкг/кг массы тела. Однако эпидемиологические исследования выявили, что для

эффекта – рак легких – $BMDL_{0,5}^1$ составляет 3,0 мкг/кг массы тела в сутки, для эффектов – рак легких, кожи, мочевого пузыря, поражение кожи – $BMDL_{0,1}$ от 0,3 до 8,0 мкг/кг, что повлекло аннулирование допустимой дозы в 15 мкг/кг [16,17].

Одним из основных пищевых источников мышьяка для человека является рис. Растения риса накапливают мышьяк, поступающий из воды и почвы, в зерне и соломе. Рис может со-

¹ Эталонная доза (BMD) – это концентрация/доза вещества, которая вызывает заранее определенное изменение скорости реакции на неблагоприятное воздействие. Заранее определенное изменение скорости реакции на неблагоприятное воздействие называется эталонным ответом (BMR, benchmark response). $BMDL_{0,5}$ – концентрация/доза вещества, при которой ответ на неблагоприятное воздействие на 0,5% ниже, чем эталонный ответ. Рассчитанное значение BMDL используют для оценки уровней воздействия вещества на население (включая чувствительные подгруппы), которые при ежедневном внутрижелудочном или дермальном путях поступления не будут иметь заметного риска вредных эффектов в течение всей жизни. BMDL более надежен, чем NOAEL, т.к. меньше зависит от выбора дозы и размера выборки. $BMDL < BMD < NOAEL$.

Таблица 3

Допустимые уровни содержания ртути / метилртути в пищевых продуктах [2, 4, 15]

Регламент Комиссии ЕС 1881/2006, Hg мг/кг, не более	Кодекс Алиментариус CXS 193-1995, MeHg, мг/кг	ТР ТС 021/2011, Hg мг/кг, не более
Рыба		
1,0 тунец 1,0 акула 1,0 марлиновые 1,0 удильщик 1,0 щука	1,2 тунец 1,5 бериксовые 1,7 марлиновые 1,6 акула	1,0 Тунец, меч-рыба, белуга 0,3 пресноводная нехищная 0,6 пресноводная хищная 0,5 морская (кроме видов тунец, меч-рыба, белуга)
Мясо, мясные и мясосодержащие продукты		
-	-	0,03
Мукомольно-крупяные и хлебобулочные изделия		
-	-	0,03 крупа, толокно, хлопья, мука, отруби пищевые 0,02 макаронные изделия 0,015 хлеб, булочные изделия и сдобные изделия
Овощи, картофель, бахчевые, фрукты, ягоды и продукты из них		
-	-	0,02
Соль пищевая		
-	0,1*	0,1
Природная минеральная вода		
-	0,001**	0,005

Примечание: *Данные на ртуть, ** мг/л.

держат как неорганические формы (арсениды и арсенаты), так и органические соединения (монометиларсоновую и какодилловую кислоты), причем наиболее токсичными и опасными являются неорганические производные (табл. 5). Поскольку содержание мышьяка в рисе вызывает особую озабоченность, Комитетом Кодекс Алиментариус был разработан «Свод правил и норм по предотвращению и снижению загрязнения риса мышьяком» (CAC/RCP 77-2017), согласно которому национальным или профильным органам контроля качества пищевых продуктов следует рассмотреть возможность реализации мер в отношении источников загрязнения, в частности осуществлять контроль содержания мышьяка в оросительной воде, в почве рисовых полей, выявлять и контролировать потенциальные источники мышьяка (выбросы в атмосферу и промышленные сточные воды, пестициды, структурообразователи почвы и удобрения, ветеринарные препараты, корма, отходы). Кроме того, необходимо информировать все заинтере-

сованные стороны о риске и пользе потребления шлифованного и/или обрубленного риса (шлифованный рис содержит меньше мышьяка, чем обрубленный рис), а также о возможных технологиях приготовления риса, позволяющих снизить содержание мышьяка в готовом продукте [19].

В настоящее время содержание мышьяка в продуктах питания не регламентируется на уровне ЕС, что связано с отсутствием аналитических методов контроля, утвержденных в установленном порядке. Согласно Директиве 98/83/ЕС в питьевой воде для мышьяка установлена предельно допустимая концентрация 10 мкг/л [20].

Комиссией Кодекс Алиментариус разработаны нормативы только для риса шлифованного (0,2 мг/кг) и обрубленного (0,35 мг/кг) и жиров/масел (0,1 мг/кг), что полностью согласуется с нормативами, установленными в Российской Федерации (0,2 мг/кг и 0,1 мг/кг, соответственно). Стоит также отметить, что содержание мышьяка в основных продуктах питания по данным мониторинга ВОЗ, проведенного в различных регионах

Таблица 4

Содержание мышьяка в продуктах питания по данным ВОЗ (GEMS/Food contaminants database), период 2008 – 2020 и допустимые уровни содержания по стандартам Кодекс Алиментариус и ТР ТС 021/2011 [16, 17, 18, 15, 2]

Наименование	Содержание мышьяка, мг/кг	Допустимый уровень, Кодекс Алиментариус, мг/кг	Допустимый уровень ТР ТС 021/2011, мг/кг
Молоко	0,001-0,17	-	0,05
Молочные продукты	0,010-0,35	-	0,05
Жиры, масла	0,003-0,22	0,1	0,1
Мясо	0,002 - 0,78	-	0,1
Субпродукты	0,007-0,47	-	1,0
Яйца	0,003-0,04	-	0,6 (яичные продукты сухие, яичный порошок, белок, желток)
Фрукты	0,003-2,20	-	0,2
Овощи (кроме грибов)	0,001-1,35	-	0,2
Зерновые (кроме риса)	0,007-0,43	-	0,2
Рис	0,002-1,85	0,2 (шлифованный) 0,35 (обрушенный)	0,2
Морская рыба	0,10-62	-	5,0
Пресноводная рыба	0,060-4,72	-	1,0
Соль пищевая	-	0,5	1,0

мира, находится на уровнях существенно ниже нормативов, установленных в РФ (табл. 4).

Свинец

В окружающей среде свинец встречается преимущественно в неорганической форме. Воздействие на организм человека происходит через пищу, воду, пыль, вдыхаемый воздух и почву. В рамках Европейского Союза было проведено 7-летнее исследование, где государствами-членами было предоставлено 94126 результата о содержании свинца в различных пищевых продуктах и водопроводной воде [21]. При анализе собранной информации были выделены категории продуктов питания, которые являются основными «поставщиками» свинца в организм. К ним относятся зерновые продукты, картофель, крупы (кроме риса), смешанные блюда на основе злаков, листовые овощи. Стоит заметить, что уровень свинца примерно в 2/3 образцов был ниже предела обнаружения [21].

Можно проследить количество поступления свинца в организм с пищей у разных возрастных категорий (табл. 6). В среднем, люди в возрасте 15-25 лет потребляют свинец с пищей в количестве от 0,36 до 1,24 мкг/кг массы тела, женщины детородного возраста – от 0,38 до 1,28 мкг/кг массы тела, младенцы 3-х месяцев, находящиеся на

грудном вскармливании, потребляют 0,21 мкг/кг массы тела, младенцы на искусственном вскармливании (молочные смеси) – от 0,27 до 0,63 мкг/кг массы тела. У детей от 1 года до 3-х лет потребление свинца алиментарным путем выше остальных возрастных категорий от 1,10 до 3,10 мкг/кг массы тела. Дети в возрасте от 4-х до 7-ми лет потребляют от 0,80 до 2,61 мкг/кг массы тела [21].

Следует отметить, что дополнительными источниками свинца для детей 2-х лет являются пыль и почва, количество поступающего свинца – от 0,18 до 0,80 мкг/кг массы тела. Этот момент важен, так как доказано, что усвоение свинца детским организмом больше, чем взрослым. Аккумулируется тяжелый металл в мягких тканях, а со временем переходит в костную ткань. Соотношение концентраций свинца в тканях организма взрослого человека составляет: костная ткань 90%, печень 1%, кора почек 0,8 %, мозговое вещество почки 0,5 %, поджелудочная железа 0,4%, яичник 0,4%, селезенка 0,3%, простата 0,2%, головной мозг 0,1%, жировая ткань 0,1%, сердце 0,07%, скелетные мышцы 0,05% (рис.). Концентрация свинца в костях детей составляет 70% и увеличивается в процессе взросления. У детей свинец кумулируется преимущественно в губчатых костях, у взрослых равномерно

Таблица 5

Острая токсичность, мутагенное и канцерогенное действие производных мышьяка [13, 14]

DL₅₀, в/ж, мг/кг, класс опасности по ГОСТ 12.1.007-76	Мутагенное действие	Канцерогенное действие
Диметиларсиновая кислота (CAS 75-60-5)		
644, крысы 3 класс опасности, умеренно опасные	Вызывает повреждение ДНК в клетках лёгких у мышей; хромосомные aberrации в тестах in vitro.	Группа 2 В - возможно канцерогенные для человека. Тесты на мышах – аденомы и карциномы легких. 0, 50, 200, 400 ppm (в питьевой воде), мыши, 50 недель: - папиллярные аденомы и аденокарциномы (у 14%, 36%, 50%, 77% соответственно дозе); 0, 12,5, 50, 200 ppm (в питьевой воде), крысы, 104 недели: - гиперплазия мочевого пузыря (у 39% при дозе 50 ppm, 45% при дозе 200 ppm); - папилломы мочевого пузыря (у 2% при дозе 50 ppm, 2% при дозе 200 ppm); - карцинома мочевого пузыря (у 19% при дозе 50 ppm, 39% при дозе 200 ppm); - папилломы/карциномы мочевого пузыря (у 26% при дозе 50 ppm, 39% при дозе 200 ppm).
Метилмышьяковая кислота (CAS 124-58-3)		
961, крысы 3 класс опасности, умеренно опасные	Увеличение частоты хромосомных aberrаций в клетках костного мозга (тесты на крысах).	Группа 2 В - возможно канцерогенные для человека. 10, 50, 200, 400 ppm (в питьевой воде), мыши, 104 недели: без изменений.
Димышьак триоксид (CAS 1327-53-3)		
15-24, крысы 2 класс опасности, высокоопасные	Хромосомные aberrации, эндоредупликация в тестах in vitro. Генотоксичность в тестах in vivo (хромосомная aberrация в клетках костного мозга млекопитающих).	Группа 1 – безусловно канцерогенные для человека. (Мышьак и его неорганические соединения) 0, 50, 200 ppm (в питьевой воде), крысы, 2 года: - аденома печени (9%, 14%, 24% соответственно дозе)
Натрий арсенит (CAS 7784-46-5)		
41, крысы 2 класс опасности, высокоопасные		Группа 1 – безусловно канцерогенные для человека. (Мышьак и его неорганические соединения) 0, 50, 100, 200 мг/л (в питьевой воде), крысы, 167 недель: - опухоли в почках (для самок - 2%, 2%, 10%, 10% соответственно дозе; для самцов - 4% при дозе 50 и 100 мг/л).
Натрий арсенат (CAS 13464-38-5, 13510-46-8)		
112, крысы 2 класс опасности, высокоопасные	Хромосомные aberrации в тестах in vitro.	Группа 1 – безусловно канцерогенные для человека. (Мышьак и его неорганические соединения) 0, 1, 10, 100 ppm (в питьевой воде), мыши, 18 мес: - аденома легких (у 13% при дозе в 100 ppm); - аденокарцинома легких (у 47%, 77%, 73%, 63% соответственно дозе).

Примечание: Мышьак проникает через гематогонадный барьер, накапливается в семенниках и вызывает их поражение. В тестах на животных вызывает задержку роста плода, постимплантационную гибель плода. Тератогенная токсичность (аномалии развития ЦНС и опорно-двигательного аппарата, нарушение развития иммунной и ретикулоэндотелиальной систем).

Таблица 6

Поступление свинца в организм человека с пищей у разных возрастных категорий [21]

Возрастные категории		Путь воздействия	Диапазон воздействий в день (мкг/кг массы тела)
Люди в возрасте от 15 до 25 лет		в/ж	0,36-1,24
Младенцы 3-х месяцев	грудное молоко	в/ж	0,21
	молочная смесь	в/ж	0,27-0,63
Дети от 1 года до 3-х лет		в/ж	1,10-3,10
Дети от 4-х лет до 7-ми лет		в/ж	0,80-2,61
Дети 2-х лет (через пыль и почву)		в/ж	0,18-0,80
Женщины от 20-ти до 40 лет		в/ж	0,38-1,28
Наружный воздух		инг.	0,001-0,003

и в губчатых, и трубчатых костях. Во время беременности происходит мобилизация свинца из костной ткани материнского организма в костную ткань плода. Так же установлена мобилизация свинца из костной ткани в кровь у женщин во время лактации. Период полувыведения свинца в крови 30 дней, в костях составляет приблизительно 10-30 лет [21].

К критическим последствиям воздействия свинца на организм, можно отнести: нейротоксичность (замедление развития, снижение уровня коэффициента интеллекта (IQ) у детей младшего возраста), сердечно-сосудистые эффекты, гипертонию и нефротоксичность у взрослых. Так же следует отметить, что свинец проникает через гематоэнцефалический и плацентарный барьеры; входит в перечень потенциально опасных химических веществ по действию на репродуктивную систему, вызывает аномалии развития у потомства. Международное агентство по изучению рака (МАИР) классифицировало неорганический свинец как вероятно канцерогенный для человека (группа 2А) в 2006 г [22].

Экспертами Европейского Агентства по безопасности продуктов питания (EFSA) были определены значения свинца, при которых идет воздействие на нервную систему детей (BMDL_{0,1} 12 мкг/л / 0,50 мкг/кг массы тела в сутки), на почки (BMDL_{0,1} 15 мкг/л / 0,63 мкг/кг массы тела в сутки), изменяется систолическое артериальное давление (BMDL_{0,1} 36 мкг/л / 1,5 мкг/кг массы тела в сутки). Группа EFSA пришла к выводу, что предварительное допустимое недельное потребление свинца 25 мкг/кг массы тела, установленное Объединенным комитетом экспертов ФАО / ВОЗ по пищевым продуктам, не является в настоящее время приемлемым [22].

Комиссией Кодекс Алиментариус были разработаны допустимые уровни содержания свинца для основных категорий пищевых продуктов, в том числе злаковых и продуктов из злаковых (0,2 мг/кг), молока и молочных продуктов (0,02 мг/кг), корнеплодов (0,1 мг/кг), фруктовых соков (0,03 мг/кг), мяса (0,1 мг/кг) и других (табл. 7) с учетом объема потребления данного вида пищевого продукта человеком, реального содержа-

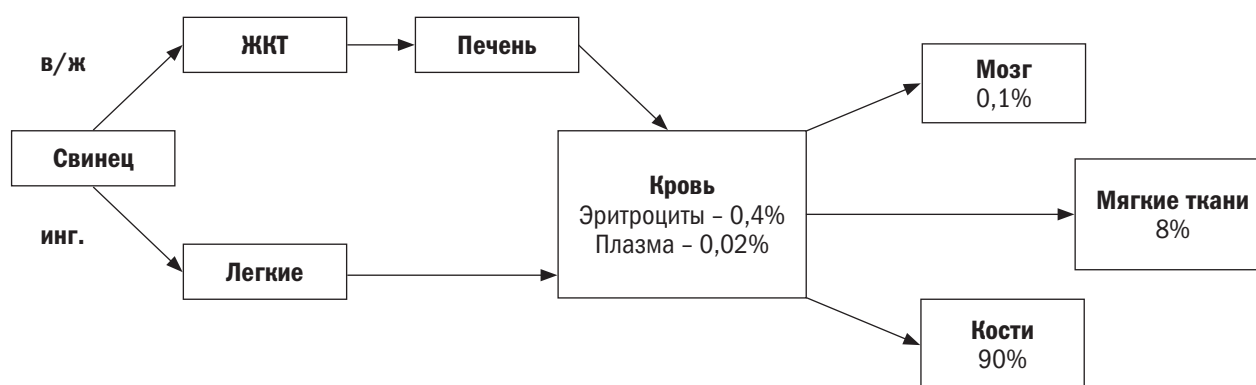


Рис. Распределение свинца в организме человека

Таблица 7

Допустимые уровни содержания свинца в продуктах питания [2,4,15]

Продукт питания	Максимальные уровни (Регламент Комиссии ЕС 1881/2006), мг/кг, не более	Кодекс Алиментариус CXS 193-1995, мг/кг	Допустимые уровни ТР ТС 021/2011, мг/кг, не более
Злаковые и продукты из злаковых	0,2	0,2	0,351) 0,5
Рыба	0,3	0,3	1
Ракообразные	0,5	-	10
Молоко	0,02	0,02	0,1
Молочные продукты		0,02	0,32) 0,53)
Жиры и масла, включая молочный жир	0,1	0,08	0,1
Адаптированные, частично адаптированные молочные смеси	0,02	0,01	0,02
Корнеплоды, бахчевые	0,1	0,1	0,5
Листовые овощи	0,3	0,3	0,5
Фруктовые соки	0,05	0,03	0,4
Фрукты	0,1	0,1	0,4
Мясо	0,1	0,1	0,5
Печень	0,5	0,1	0,6
Яйца птиц	-	-	0,3

Примечание: 1) – хлебобулочные изделия; 2) – творог; 3) – сыры.

ния свинца в продукте по данным мониторинга и концентраций, при которых возможно наступление неблагоприятных последствий для здоровья человека.

Сравнительный анализ допустимых уровней содержания свинца в пищевых продуктах показал, что по основным видам продукции нормативы, действующие в Российской Федерации и установленные в ТР ТС 021/2011, многократно (молоко в 5 раз, молочные продукты в 15-25 раз, корнеплоды в 5 раз, рыба в 3 раза, ракообразные в 20 раз, фруктовые соки в 13 раз, фрукты в 4 раза, мясо в 5 раз) превосходят аналогичные нормативы, действующие в странах ЕС (Регламент Комиссии ЕС 1881/2006 и/или рекомендованные Кодекс Алиментариус (CXS 193-1995).

Принимая во внимание тот факт, что ТР ТС 021/2011, действующий в Российской Федерации, разрабатывался десять лет назад, международный опыт по нормированию свинца в пище-

вых продуктах и общую тенденцию на снижение данного норматива, целесообразным является проработка вопроса о необходимости пересмотра части нормативов заинтересованными федеральными органами исполнительной власти Российской Федерации совместно с ЕАЭС.

В настоящее время в международном сообществе рассматривается предложение Комитета Кодекс Алиментариус по установлению максимального допустимого уровня содержания свинца в следующих продуктах питания: яйца – 0,1 мг/кг, яичные продукты сухие – 1,5-2,0 мг/кг, свежие кулинарные травы – 0,2 мг/кг, сушеные кулинарные травы – 2,0 мг/кг, специи, в том числе фрукты и ягоды – 0,6 мг/кг, корневища, луковицы и корни (сушеные) – 2,5 мг/кг, корневища, луковицы и корни (свежие) – 0,8 мг/кг, цветки – 1,0 мг/кг, семена – 0,9 мг/кг, для последнего включения данных видов продукции в CXS 193-1995 [8].

Кроме того, Комиссия Кодекс Алиментариус разрабатывает предложение по максимальным допустимым уровням содержания свинца в винах, в том числе крепленых, субпродуктах крупного рогатого скота, свиней, домашней птицы [23].

Анализ рынка, выполненный экспертами ФАО/ВОЗ, показал, что 100% проб вина содержали свинец на уровне, не превышающем 0,2 мг/кг (действующий норматив в ЕС), 100% – не превышающем 0,15 мг/кг, 99% – 0,1 мг/кг, 97% – 0,05 мг/кг. Поэтому на обсуждение были вынесены два норматива 0,1 мг/кг и 0,05 мг/кг. В пользу установления нового норматива по содержанию свинца на уровне 0,1 мг/кг (т.е. снижение действующего норматива в 2 раза) свидетельствуют:

- меньшее влияние на экономическую ситуацию в отрасли (только 1% продукции не соответствует данному нормативу);
- при установлении содержания свинца на уровне 0,05 мг/кг 5-11% продукции категории «десертное вино» и «белое вино» будут содержать свинец выше норматива;
- вино не употребляется детьми, поэтому нет необходимости устанавливать такие же низкие уровни, как для виноградного сока.

Для крепленых вин и ликеров предложен норматив 0,15 мг/кг свинца для вина, изготовленного из винограда, собранного после вступления решения в законную силу.

Кадмий

В окружающую среду кадмий попадает со сточными водами, при сжигании отходов, при использовании удобрений. Как следствие, происходит загрязнение почвы, что приводит к увеличению поглощения кадмия растениями. Моллюски, ракообразные и грибы являются естественными накопителями кадмия. Основным фактором воздействия тяжелого металла на человека являются пищевые продукты и питьевая вода [24].

Кадмий не участвует в биологических процессах у животных и людей, но имитирует другие необходимые двухвалентные металлы, чем нарушает процессы в организме. Непосредственно всасывание этого металла невелико (3-5%), но стоит учитывать значительную способность к кумуляции и длительный период выведения (10-30 лет). Большая восприимчивость к кадмию характерна людям, страдающим дефицитом железа (концентрация ферритина в сыворотке ниже 30 мкг/л). Распределение кадмия происходит в основном между печенью (15%), почками (50%), мышцами (12%) и другими тканями [24]. Важно отметить, что во время беременности, плацента является органом активно кумулирующим тяжелый металл. Критическим органом-мишенью являются почки, точнее проксимальные канальцы, где происходит основное накопление кадмия, что приводит к почечной дисфункции, как итог – по-

чечная недостаточность. Вследствие нефротоксического эффекта либо прямого действия, кадмий является причиной деминерализации костей. Также кадмию свойственны нейротоксичность, генотоксичность, канцерогенность, тератогенность, эндокринные и репродуктивные эффекты. По данным Международного агентства по изучению рака (МАИР), кадмий классифицируется как канцероген для человека – группа 1 [25].

В период с 2003 по 2007 год Европейским Агентством по безопасности продуктов питания (EFSA) было проведено исследование по содержанию кадмия в продуктах питания. Информация об образцах продуктов с содержанием кадмия была получена от 20-ти государств-членов Европейского Союза. Наиболее высокие концентрации кадмия обнаружены в следующих пищевых продуктах: водоросли, рыба и морепродукты, шоколад. Только в 5% исследованных проб уровень кадмия превышал допустимые уровни.

Отмечено, что в среднем человек потребляет кадмия с пищей в диапазоне от 1,9 до 3,0 мкг/кг массы тела в неделю. Не менее значимый путь поступления кадмия в организм ребенка (в возрасте ~ от года до трех лет) – пыль [24].

В 2010 году Объединенный комитет экспертов ФАО/ВОЗ по пищевым продуктам поднял вопрос о пересмотре допустимого уровня поступления кадмия в организм человека в результате его естественного содержания в пищевых продуктах и питьевой воде. Ранее было установлено допустимое недельное поступление на уровне 7 мкг/кг массы тела. Учитывая длительный период выведения кадмия из организма, значения ежедневного поступления не имеют значительного влияния на общую экспозицию. Воздействие кадмия на организм влечет хронические заболевания, поэтому был установлен допустимый уровень месячного поступления в 25 мкг/кг массы тела [24].

Сравнительный анализ допустимых уровней содержания кадмия в продуктах питания (табл. 8) показывает, что для основных категорий продуктов питания, включая овощи и корнеплоды в Российской Федерации установлены более жесткие нормативы, чем в странах ЕС.

Отдельно стоит обратить внимание на регулирование кадмия в какао-бобах и продукции на их основе.

Согласно предложению Комиссии Кодекс Алиментариус, максимальный уровень содержания кадмия в шоколаде, содержащем <30% какао в пересчете на сухой остаток, не должен превышать 0,3 мг/кг. Против данного предложения выступают Евросоюз, Швейцария и Марокко, мотивируя свое решение тем, что для данного вида продукции необходимо установить более жесткий норматив 0,1 мг/кг, обеспечивающий лучшую защиту здоровья потребителей, особен-

Таблица 8

Допустимые уровни содержания кадмия в продуктах питания [2,4,15]

Продукт питания	Максимальные уровни Регламент Комиссии ЕС 1881/2006, мг/кг, не более	Кодекс Алиментариус CXS 193-1995	Допустимые уровни ТР ТС 021/2011, мг/кг, не более
Злаковые и продукты из злаковых	0,1	0,11) 0,42)	0,1
Рыба	0,1	-	0,2
Моллюски двустворчатые	1	2	2
Шоколад	0,13) 0,34) 0,85) 0,66)	0,8	0,5
Овощи	0,27) 0,058)	0,1 0,059)	0,03
Корнеплоды	0,1	0,1	0,03
Печень	0,5	-	0,3
Молоко	-	-	0,03
Мясо	0,05	-	0,05

Примечание: 1) – злаки; 2) – шлифованный рис; 3) – молочный шоколад с содержанием какао <30%; 4) – шоколад с содержанием какао <50%, молочный шоколад с содержанием какао ≥30%; 5) – шоколад с содержанием какао ≥50%; 6) – какао порошок (горячий шоколад); 7) – листовые и стеблевые овощи; 8) – овощи кроме корнеплодов, стеблевых, листовых; 9) – капуста, луковичные, сладкая кукуруза

но детей. Евросоюз подчеркивает, что концепция пропорциональности (максимальные уровни содержания кадмия в шоколаде, содержащем 50-70% и >70% какао, 0,8 и 0,9 мг/кг, соответственно) неприменима в данном случае, поскольку дети являются потребителями в основном молочного шоколада. По оценке кодекса алиментариус для детей вклад шоколадной продукции составляет примерно 6,4% от общего кадмия, поступившего в организм с продуктами питания, что находится на третьем месте после картофеля и картофельной продукции (13,6%), а также хлеба и роллов (9,9%). Марокко указывает на то, что основные мировые поставщики какао (Камерун, Кот-д'Ивуар, Гана и Нигерия), на долю которых приходится до 75% производства какао, способны обеспечить уровень менее 0,3 мг/кг.

Предложение поддерживают Канада, Колумбия, Казахстан, США, Европейская ассоциация производителей какао. США мотивирует свое решение тем, что норматив 0,3 мг/кг разработан на основе принципа пропорциональности, утвержденного на 41 заседании Комиссии Кодекс Алиментариус (CAC41, 2018), и является компромиссным решением, учитывающим негативный экономический эффект для некоторых стран Латинской Америки и Карибского региона.

Согласно ТР ТС 021/2011 допустимый уровень кадмия в шоколаде и изделиях из него, какао-бобах и какао-продуктах составляет не более 0,5 мг/кг. Данный показатель установлен без учета фактического содержания какао в шоколаде и изделиях из него, т.е. нет градации по содержанию какао <30%, 50-70%, >70%. Возможно, следует проработать вопрос о необходимости пересмотра соответствующего норматива в странах Евразийского Экономического Союза с учетом международного опыта и оценки риска, проведенной Евросоюзом.

В заключении отметим, что в 2019 году Комиссия Кодекс Алиментариус включила в приоритетный перечень загрязняющих веществ и природных токсикантов, для которых необходимо разработать / пересмотреть токсикологические профили, провести оценку канцерогенного и неканцерогенного рисков, а также оценку воздействия следующие вещества [23]:

- диоксины и диоксиноподобные полихлорированные бифенилы;
- мышьяк (неорганический / органический);
- скополетин (сок нони);
- алколоиды спорыньи;
- трихотеценовые микотоксины (Т2, НТ2).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/REFERENCES:

1. Safety Food. World Health Organization. Available at <http://www.who.int/health-topics/food-safety>.
2. Технический регламент Таможенного союза ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции» / Technical Regulation EAEU TR CU 021/2011 «On safety of food» (in Russian).
3. Council Regulation EEC № 315/93 of 8 February 1993. Available at <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:31993R0315&from=EN>.
4. Commission Regulation EC No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Available at EUR-Lex – 32006R1881 – EN – EUR-Lex (europa.eu).
5. Codex Alimentarius. Homepage.
6. Proposed draft MLs for AFT and OTA in nutmeg, dried chili and paprika, ginger, pepper and turmeric and associated sampling plans. REP19/CF, para. 81. Codex Alimentarius, 2020. Available at: www.codexalimentarius.org.
7. Proposed draft MLs for AFT in certain cereals and cereal-based products including foods for infants and young children. CX/CF 20/14/10. Codex Alimentarius, 2020. Available at: www.codexalimentarius.org.
8. Proposed draft MLs for lead in certain food categories. CX/CF 20/14/8. Codex Alimentarius, 2020. Available at: www.codexalimentarius.org.
9. CX/CF 20/14/11. Joint FAO/WHO food standards program Codex Committee on contaminants in foods. 14th Session Utrecht, the Netherlands, 20 – 24 April 2020. Discussion paper on maximum levels for methylmercury in additional fish species. Available at: www.codexalimentarius.org.
10. Draft ML for cadmium for chocolates containing or declaring, <30% total cocoa solids on a dry matter basis. CX/CF 20/14/5. Codex Alimentarius, 2020. Available at: www.codexalimentarius.org.
11. Proposed draft MLs for cadmium in chocolates and cocoa-derived products. CX/CF 20/14/6. Codex Alimentarius, 2020. Available at: www.codexalimentarius.org.
12. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM); Scientific Opinion on the risk for public health related to the presence of mercury and methylmercury in food. EFSA Journal 2012; 10(12): 2985. [241 pp.] doi:10.2903/j.efs.2012.2985. Available online: www.efsa.europa.eu/efsajournal.
13. ECHA. European Chemicals Agency's Dissemination portal with information on chemical substances registered under REACH.
14. Автоматизированная распределенная информационно-поисковая система (АРИПС) «Опасные вещества» / Automated distributed Information Retrieval System (ARIPS) «Hazardous Substances» (in Russian).
15. General standard for contaminants and toxins in food and feed. CXS 193-1995. Codex Alimentarius. Available at: www.codexalimentarius.org.
16. European Food Safety Authority, 2014. Dietary exposure to inorganic arsenic in the European population. EFSA Journal 2014;12(3):3597, 68 pp. doi:10.2903/j.efs.2014.3597 Available online: www.efsa.europa.eu/efsajournal.
17. Safety evaluation of certain contaminants in food. Arsenic. WHO Food Additives Series: 63. FAO JECFA Monographs 8, 2011, Geneva.
18. GEMS/Food contaminants database.
19. САС/РСР 77-2017 «Свод правил и норм по предотвращению и снижению загрязнения риса мышьяком». Codex Alimentarius, 2017 / САС/РСР 77-2017 «Code of Practice for the Prevention and Reduction of Arsenic Contamination in Rice», 2017 (in Russian, English). Available at: www.codexalimentarius.org.
20. Council Directive 98/83/EC of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption. Available at EUR-Lex – 31998L0083 – EN – EUR-Lex (europa.eu).
21. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM); Scientific Opinion on Lead in Food. EFSA Journal 2010; 8(4):1570. [151 pp.]. doi:10.2903/j.efs.2010.1570. Available online: www.efsa.europa.eu.
22. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Volume 87. Inorganic and Organic Lead Compounds.
23. Joint FAO/WHO food standards programme Codex Alimentarius Commission 42nd Session Geneva, Switzerland 8 – 12 July 2019. Report of the 13rd Session of the Codex Committee on contaminants in foods Yogyakarta, Indonesia 29 April – 3 May 2019. Available at: www.codexalimentarius.org.
24. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on cadmium in food. EFSA Journal (2009) 980, 1-139.
25. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Volume 58. Beryllium, Cadmium, Mercury, and Exposures in the Glass Manufacturing Industry.

*Kh.Kh. Khamidulina^{1,2}, E.V. Tarasova¹, E.A. Rinchindorzheva¹, A.S. Proskurina^{1,2},
A.R. Egiazaryan¹, I.V. Zamkova¹, E.V. Dorofeeva¹, S.A. Shvykina¹, D.N. Rabikova^{1,2}, N.I. Nikolaeva³,
A.S. Filin³, D.A. Lebedeva⁴*

HIGHLIGHTS OF INTERNATIONAL REGULATION OF LEAD, CADMIUM, MERCURY AND ARSENIC CONTENTS IN FOOD

¹Russian Register of Potentially Hazardous Chemical and Biological Substances of Rospotrebnadzor, 121087, Moscow, Russian Federation

²Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, RF Ministry of Health, 125993, Moscow, Russian Federation

³I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, 119435, Moscow, Russian Federation

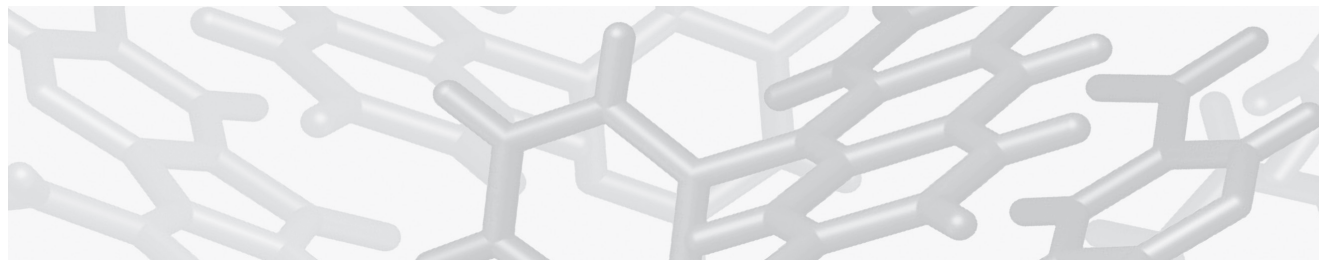
⁴National Research University Higher School of Economics, 101000, Moscow, Russian Federation

The article presents an overview of current issues of international regulation of the content of heavy metals (lead, cadmium, mercury and arsenic) in food. Special attention is paid to the revision of the standards for the content of arsenic in rice, mercury in some types of fish, cadmium in chocolate, lead in meat, offal, and wine. A comparative analysis of the standards -permissible levels of content of heavy metals in food products in the EU and the Russian Federation is carried out.

Keywords: *lead, cadmium, mercury, arsenic, food products, rationing.*

Quote: Kh.Kh. Khamidulina, E.V. Tarasova, E.A. Rinchindorzheva, A.S. Proskurina, A.R. Egiazaryan, I.V. Zamkova, E.V. Dorofeeva, S.A. Shvykina, D.N. Rabikova, N.I. Nikolaeva, A.S. Filin, D.A. Lebedeva. Highlights of international regulation of lead, cadmium, mercury and arsenic contents in food. Toxicological Review. 2021; 1:2-13.

Материал поступил в редакцию 18.11.2020 г.



УДК 616.36-002:615.361.36

DOI: 10.36946/0869-7922-2021-1-14-19.

МОРФОМЕТРИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА РЕГЕНЕРАТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ В ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ОСТРОМ ТОКСИЧЕСКОМ ГЕПАТИТЕ И ТРАНСПЛАНТАЦИИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Е.Г. Трапезникова¹, В.Б. Попов¹,
А.С. Радиллов¹, В.В. Шилов²

¹ФГУП «Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России, 188663, Ленинградская область, Всеволожский район, г.п. Кузьмоловский, Российская Федерация

²ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Минздрава России, 191015, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

Проведено экспериментальное моделирование острого токсического гепатита у лабораторных животных (половозрелых крыс-самцов линии «Wistar») с помощью однократного внутрижелудочного введения масляного раствора четыреххлористого углерода (CCl₄) в дозе 1500 мг/кг. Гистологически подтверждено, что CCl₄ вызывает обширные центрлобулярные некротические изменения паренхимы печени, нарушение углеводного и белкового обмена в гепатоцитах, с последующим развитием жировой дистрофии органа.

С целью изучения терапевтического потенциала клеточных культур для терапии поражений при остром токсическом гепатите использовали линию мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток (ММСК) дифференцированных из эмбриональных тканей мышечной ткани. Животные были разделены на две экспериментальные группы: 1-я группа (контроль) – введение CCl₄ в дозе 1500 мг/кг; 2-я группа – введение CCl₄ в дозе 1500 мг/кг, через 8 часов внутривенная инъекция суспензии содержащей ММСК в количестве 1,5 млн. на животного.

В ходе исследования была доказана миграция трансплантированных ММСК мышечной ткани в пораженную ткань печени крыс. Выявлено положительное действие трансплантированных ММСК на основные патофизиологические процессы при остром токсическом гепатите у крыс, проявляющиеся в уменьшении некротических, воспалительных и дистрофических процессов в паренхиме печени. По данным морфометрического анализа, инъекция суспензии ММСК приводила к статистически значимому уменьшению площади воспалительных инфильтратов на 3-е и 5-е сутки, уменьшению проявлений жировой дистрофии на 7-е сутки после воздействия CCl₄. Полученные результаты свидетельствуют о высоком терапевтическом потенциале ММСК для коррекции состояний при острых токсических поражениях печени.

Ключевые слова: морфометрическое исследование, четыреххлористый углерод, острый токсический гепатит, мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки, лечение токсического поражения.

Цит: Е.Г. Трапезникова, В.Б. Попов, А.С. Радиллов, В.В. Шилов. Морфометрическая оценка регенеративных процессов в печени крыс при остром токсическом гепатите и трансплантации мезенхимальных стволовых клеток. Токсикологический вестник. 2021; 1:14-19.

Введение. Согласно данным Роспотребнадзора, в 2019 году в Российской Федерации наблюдалась тенденция, связанная с уменьшением комплексной химической нагрузки на население страны (на 14,1 %, по сравнению с 2012 годом) [1]. Несмотря

на выявленную положительную динамику, частота заболеваний, ассоциированных с воздействием химических факторов, продолжает оставаться на прежнем, достаточно высоком уровне [2]. Данная ситуация, прежде всего, обусловлена

Трапезникова Елена Геннадьевна (Trapeznikova Elena Gennad'evna), научный сотрудник лаборатории спортивной гигиены ФГУП «НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России, г. Санкт-Петербург, pishite22@mail.ru;

Попов Вадим Борисович (Popov Vadim Borisovich), доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории общей токсикологии и гигиенического нормирования ФГУП «НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России, г. Санкт-Петербург, vrovov1@mail.ru;

Радиллов Андрей Станиславович (Radilov Andrej Stanislavovich), доктор медицинских наук, профессор, и.о. директора ФГУП «НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России, г. Санкт-Петербург, a.radilov@icloud.com;

Шилов Виктор Васильевич (Shilov Viktor Vasil'evich), доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой токсикологии, экстремальной и водолазной медицины ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Минздрава России, г. Санкт-Петербург, VShilov@inbox.ru

увеличением бытовых случаев отравлений. Так, в 2018 году в РФ был зарегистрирован самый высокий показатель острых отравлений связанный с приемом спиртосодержащей продукции.

В структуре заболеваемости токсической этиологии острые гепатиты занимают лидирующее положение, и, как правило, затрагивают группу взрослого, трудоспособного населения. Высокий риск развития неблагоприятных последствий острого токсического гепатита в виде острой печеночной недостаточности или фибротического перерождения органа с развитием цирроза органа в значительной степени определяют показатели заболеваемости и смертности среди населения и обуславливают актуальность лечения данных состояний [4].

Несмотря на высокие достижения в области клинической токсикологии и фармакологии, применение стандартных дезинтоксикационных, симптоматических мероприятий для лечения острых гепатитов не всегда эффективно [3]. В связи с этим, поиск и внедрение новых средств и методов лечения заболеваний печени токсической этиологии является важной и актуальной задачей.

Перспективным направлением для терапии многих заболеваний в настоящее время является регенеративная медицина. Результаты значительного числа экспериментальных исследований, проведенных в России и за рубежом, свидетельствует об эффективности применения дериватов стволовых клеток для коррекции многих хронических заболеваний у лабораторных животных [5, 6, 7, 8]. В клинической практике применение стволовых клеток уже стало рутинным методом лечения многих заболеваний. Трансплантация мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток (ММСК) совместно с аллогенной пересадкой костного мозга успешно решает проблему возможного развития «реакции трансплантат против хозяина» в терапии онкогематологических заболеваний [9, 10]. Накоплен большой опыт использования стволовых клеток и их производных для лечения нейродегенеративных болезней [11], заболеваний опорно-двигательного аппарата [12, 13], а также для устранения косметических дефектов кожи, ожогов и трофических язв [14] и др.

Несмотря на то, что методы регенеративной медицины нашли широкое применение для лечения целого ряда хронических заболеваний, остается открытым вопрос о возможности их использования для терапии острых форм заболеваний, в том числе возникших при воздействии токсических факторов. Предполагается, что применение стволовых клеток на начальных стадиях заболеваний позволит предотвратить возникновение хронического течения болезней, а также мини-

мизировать вероятность развития осложнений, угрожающих жизни больного [15].

Таким образом, целью настоящего экспериментального исследования было изучение морфометрических показателей, отражающих регенеративные процессы в печени крыс при остром токсическом гепатите на фоне трансплантации мезенхимальных стволовых клеток.

Материалы и методы исследования. *Получение культуры ММСК и ее характеристики.* Культуру ММСК получали путем направленной дифференцировки из эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) мышей линии C57Bl/6J. Из недифференцированных ЭСК методом «висячей капли» были получены 5-6 дневные эмбрионидные тельца (ЭТ). Ранние ЭТ (5-6 дней) сажали на чашки Петри, покрытые 0,1 % желатиной, культивировали в ростовой среде, лишенной ростового фактора LIF, после чего переводили на индукционную ростовую среду RPMI-1640 [16]. Выделенные клетки культивировали до 5 пассажа. В процессе культивирования из ЭТ формировалась культура мезенхимоподобных клеток.

Оценку фенотипических особенностей полученной культуры проводили, руководствуясь минимальными критериями, установленными Международным обществом клеточной терапии (ISCT) для клеток мезенхимальной природы, а именно [17]:

1. Способность ММСК к адгезии к пластику при культивировании.

2. Экспрессия поверхностных антигенов (CD-90, CD-73, CD-105), отсутствие маркеров гемопоэтических клеток (CD-34, CD-45, CD-14). Оценку экспрессии осуществляли с помощью проточного цитофлуориметра (Beckman Coulter, США). Клетки трипсинизировали и окрашивали в течение 30 мин при +4°C связанными с FITC или PE антителами против CD-73, CD-90, CD-105, CD-34, CD-45, CD-14.

3. Способность к дифференциации *in vitro* в пределах одного гистологического листка при химической индукции (в хондро-, остео- и адипогенном направлении).

Моделирование острого токсического гепатита у крыс. Эксперимент выполнен на половозрелых крысах-самцах линии «Wistar», массой 170-240 г. Всех животных содержали в стандартных условиях вивария со свободным доступом к пище и воде. Опыты были выполнены в соответствии с Директивой Европейского Парламента и Совета Европейского союза – 2010/63/EU от 22.09.2010 г. Экспериментальное исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России и СЗГМУ им. И.И. Мечникова.

Моделирование острого токсического гепатита у крыс проводили путем однократного внутри-

желудочного введения масляного раствора CCl_4 в дозе 1500 мг/кг. Животные были разделены на две группы: 1-я группа (контроль) – введение CCl_4 в дозе 1500 мг/кг; 2-я группа (экспериментальная) – введение CCl_4 в дозе 1500 мг/кг с последующей внутривенной инъекцией (через 8 часов) суспензии содержащей ММСК в количестве 1,5 млн. на животного.

Эвтаназию животных осуществляли на 1-е, 3-е, 5-е и 7-е сутки после воздействия CCl_4 , для исследования изымалась печень. Гистологическую обработку образцов печени проводили по стандартным протоколам с последующей окраской готовых срезов гематоксилином-эозином [18].

Степень выраженности патоморфологических изменений в двух группах оценивали с помощью морфометрического исследования гистологических срезов печени крыс.

Гистологические срезы печени анализировали с помощью микроскопа Axioskop-40 (Carl Zeiss, Германия) при увеличении $\times 100$, $\times 200$, $\times 400$. Морфометрический анализ проводился с помощью программного обеспечения «ВидеоТест-4», Россия. В зависимости от гистологической картины остро токсического гепатита на разных сроках исследования оценивали следующие морфометрические параметры: на 1-е сутки – $S_{абс.}$ центролобулярных некрозов (мм²), соотношение $S_{н.}/S_{п.}$, где $S_{н.}$ – площадь некрозов, $S_{п.}$ – площадь неизменной паренхимы (%); на 3-е и 5-е сутки исследования – $S_{абс.}$ инфильтратов (мм²), S ядер (мкм²), количество ядрышек в ядре гепатоцитов (ед. в п/зр.), количество двуядерных гепатоцитов (ед. в п/зр.). Ядерно-цитоплазматическое отношение гепатоцитов (ЯЦО) рассчитывали по формуле – $S_{ядра}/S_{цитоплазмы}$ (усл. ед.). Митотический индекс (МИ) вычисляли, как среднее количество фигур митозов в визуализируемых полях зрения (ед. в п/зр). В связи с диффузным поражением печени жировой дистрофией на 7-е сутки после воздействия CCl_4 морфометрическое исследование не проводилось.

Статистическую обработку полученных данных выполняли с помощью компьютерных программ Prizm 5, Microsoft Excel. Нормальность распределения выборки оценивали с помощью критерия Колмогорова-Смирнова. Для сравнения средних значений морфометрических показателей в независимых группах использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Методы детекции ММСК в печени крыс. Непосредственно перед внутривенной трансплантацией проводили витальное окрашивание культуры ММСК флуоресцентным красителем РКН-26 (Sigma, США), позволяющим идентифицировать клетки в гистологических срезах печени крыс.

Исследования проводили с помощью флуоресцентного микроскопа (Nicon, Япония), при длине волны 567 нм.

Для обнаружения ДНК мышцы (ММСК) в биоптатах печени крыс использовали метод ПЦР. Идентификация ММСК мышцы проводилась с помощью амплификации видоспецифичных (для *Mus musculus* и *Rattus norvegicus*) локусов субъединицы I цитохромоксидазы (COI) по модифицированному методу [19].

Результаты и обсуждение. Полученная культура ММСК из ЭСК мышцы соответствовала общепринятым иммунофенотипическим критериям: подтверждена адгезия клеток к культуральному пластику; анализ поверхностного фенотипа культуры ММСК подтвердил наличие большинства основных маркеров мезенхимальных клеток (CD-90, CD-73, CD-105) и отсутствие маркеров кроветворных клеток (CD-34, CD-45, CD-14); подтверждена дифференциация ММСК *in vitro* в остео- и хондрогенном направлении, в присутствии индуцирующих факторов.

По данным иммунофлуоресцентного анализа, ММСК, содержащие флуоресцентную метку (РКН-26), обнаруживались в ткани печени крыс на 3 сутки после воздействия CCl_4 и во все последующие сроки исследования (5-е, 7-е сутки). Наибольшая концентрация меченых ММСК была выявлена в поврежденных зонах печени (центролобулярные отделы).

По данным ПЦР, ДНК мышцы в биоптатах печени крыс была обнаружена на 3-и, 5-е и 7-е сутки после воздействия CCl_4 . Полученные данные позволяют предположить, что миграция ММСК в поврежденный орган после внутривенной трансплантации происходила не позднее 3-х суток после трансплантации.

Гистологическая картина остро токсического гепатита после воздействия CCl_4 в дозе 1500 мг/кг у животных обеих групп характеризовалась стадийностью течения патологических проявлений в зависимости от сроков наблюдения. CCl_4 инициировал развитие некротических, инфильтративных и дистрофических изменений диффузного характера в паренхиме печени.

Морфометрический анализ гистологических срезов печени. На 1-е сутки исследования, статистически значимых различий в площади центролобулярных некрозов после воздействия CCl_4 и трансплантации ММСК между животными двух групп выявлено не было. Доля некротически измененной ткани относительно неизменной ткани печени составила 39,10 % у контрольной и 37,25 % у экспериментальной группы животных (табл. 1).

Морфометрический анализ печени на 3 сутки исследования в группе животных, которым трансплантировали ММСК, выявил следующие

Таблица 1

Морфометрические показатели печени крыс на 1 сутки после воздействия CCl_4 и трансплантации ММСК, $M \pm m$

Группа животных	Исследуемые параметры морфометрии	
	$S_{\text{абс.}}$ центролобулярных некрозов, mm^2	Сн./Сп., %
Контроль	0,125±0,022	39,10
ММСК	0,119±0,023	37,25

изменения по сравнению с контрольной группой: уменьшение площади воспалительных инфильтратов на 28,33 % ($p < 0,0001$); увеличение средней площади ядер гепатоцитов и количества ядрышек в ядре на 6,33 % ($p = 0,0013$) и 17,41 % ($p = 0,0018$) соответственно; увеличение митотического индекса на 38,03 % ($p = 0,02$) (табл. 2).

Выявленная динамика морфометрических изменений в печени крыс на 3-е сутки после однократного воздействия CCl_4 и трансплантации суспензии ММСК свидетельствовала об интенсивных структурных перестройках в клетках печени крыс, которые отражали высокую функциональную (белково-синтетическую) и пролиферативную активность по сравнению с контрольной группой. Активация собственных регенеративных процессов в печени после инъекции ММСК приводила к уменьшению морфологических проявлений токсического поражения, что проявлялось в статистически значимом уменьшении площади воспалительных инфильтратов.

На 5-е сутки исследования у животных на фоне трансплантации ММСК выявлено статистически значимое уменьшение площади центролобулярных инфильтратов (на 18,75 % ($p = 0,0173$), при этом наблюдалось снижение морфометрических показателей, отвечающих за активность регенеративных процессов по сравнению с показателями в контрольной группе.

Так, после однократного введения CCl_4 на фоне трансплантации ММСК наблюдалось уменьшение количества ядрышек в ядрах гепатоцитов на 12,05 % ($p = 0,04$), уменьшение количества полиплоидных гепатоцитов на 29,96 % ($p = 0,03$), а также митотического индекса на 42,24 % ($p = 0,02$) (табл. 2).

Анализируя динамику морфометрических показателей на 3-е и 5-е сутки исследования, стоит отметить, что у животных, которым в качестве терапевтического агента была трансплантирована суспензия ММСК морфометрические изменения свидетельствующие о внутриклеточной регенерации и пролиферативных процессах в печени, наблюдались на более раннем сроке исследования – на 3-и сутки после воздействия CCl_4 . Тогда, как у контрольной группы пик регенеративной активности по морфометрическим данным приходился на 5-е сутки, т.е. на 2-ое суток позже, чем в экспериментальной группе.

На 7-е сутки исследования наблюдалось восстановление балочно-радиарного строения печени у животных обеих групп. Выявлена незначительная очаговая инфильтрация печени круглоклеточными элементами, преимущественно в зонах повреждения. Основная патологическая картина острого токсического гепатита после воздействия CCl_4 на 7-е сутки была представлена диффузной жировой дистрофией органа разной

Таблица 2

Морфометрические показатели печени крыс на 3 и 5 сутки после воздействия CCl_4 и трансплантации ММСК, $M \pm m$

Группа животных	Исследуемые параметры морфометрии					
	$S_{\text{абс.}}$ инфильтратов, mm^2	S ядер, mm^2	ЯЦО, усл.ед.	Кол-во ядрышек, ед. в п/зр.	МИ, ед. в п/зр.	Кол-во двуядерных гепатоцитов, ед. в п/зр.
3 сутки						
Контроль	0,060±0,001	37,9±0,56	0,19±0,004	3,10±0,13	1,42±0,2	14,2±1,05
ММСК	0,043±0,001*	40,3±0,58*	0,20±0,002	3,64±0,11*	1,96±0,2*	16,9±2,3
5 сутки						
Контроль	0,016±0,008	39,58±1,7	0,17±0,007	3,07±0,1	1,16±0,14	24,7±2,3
ММСК	0,013±0,006*	36,75±1,5	0,20±0,01	2,7±0,1*	0,67±0,09*	17,3±2,6*

Примечание: * - достоверность различий $p \leq 0,05$ по сравнению с контрольной группой.

степени выраженности (от мелко- до крупнопальцевой). При качественной оценке, проявление жировой дистрофии в группе животных трансплантированным ММСК были менее выражены, по сравнению с гистологической картиной, наблюдаемой в контрольной группе.

Заключение. В ходе проведенного исследования была доказана миграция трансплантированных ММСК в ткань печени крыс, после воздействия CCl_4 . Начиная с 3-х суток и на все последующие сроки наблюдения, трансплантированные ММСК мыши, обнаруживались в ткани печени крыс и располагались преимущественно в поврежденных зонах печени (центролобулярные отделы).

Проведенный анализ морфометрических показателей печени выявил, что у животных на фоне трансплантации ММСК на 3-е сутки после воздействия CCl_4 в печени наблюдалась наибольшая активность регенеративных процессов. В контрольной группе показатели, отражающие активность естественного механизма восстановления после токсического повреждения печени, были выявлены в более поздние сроки исследования – на 5-е сутки эксперимента. Терапевтическое действие ММСК при остром токсическом гепатите у крыс проявлялось в более ранней активации процессов регенерации, а также статистически значимом увеличении показателей, характеризующих функциональную активность гепатоцитов, что, в свою очередь, приводило к до-

стоверному уменьшению инфильтративно-воспалительных и дистрофических процессов в ткани печени после воздействия CCl_4 .

Основываясь на механизмах, лежащих в основе регенеративной медицины, можно предположить, что, помимо заместительного потенциала, важным свойством ММСК является их гуморальное воздействие на клеточную нишу, в которой они оказались. Посредством продуцирования большого количества ростовых факторов, противовоспалительных цитокинов, хемокинов ММСК способны инициировать процессы внутриклеточной регенерации, пролиферации и ангиогенеза в поврежденном органе [20, 21]. Активация механизмов регенерации в значительной степени приводит к сокращению сроков заболевания и способствует предотвращению возможного персистирующего течения патологических процессов. Усиление процессов ангиогенеза в органах при их токсических повреждениях способствует уменьшению гипоксии, которые являются одними из основных патофизиологических механизмов при воздействии токсических факторов.

Таким образом, методы регенеративной медицины могут быть рассмотрены в качестве перспективного направления для терапии не только хронических, но и острых токсических поражений различных органов и тканей, прежде всего, в качестве средства, направленного на интенсификацию собственных регенеративных процессов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2019 году: Государственный доклад. – М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2020; 299.
2. Официальный сайт Росстата // URL: <https://gks.ru/folder/13721>
3. Антоненко О.М. Токсические поражения печени: пути фармакологической коррекции. Поликлиника МС. 2013; 6(2): 45-51.
4. Stravitz R.T., Lee W.M. Acute liver failure. *Lancet*. 2019; 394: 869-881.
5. Esquer F., Esquer M., Parrau D., Carpio D., Yañez A., Cong P. Systemic administration of multipotent mesenchymal stromal cells reverts hyperglycemia and prevents nephropathy in type I diabetic mice. *Blood Marrow Transplant*. 2008; 14: 631-40.
6. Wang J., Wan H. Mesenchymal stromal cells as a therapeutic treatment for ischemic stroke. *Neuroscience bull*. 2014; 30: 524-35.
7. Протасова Г.А., Шабашева Л.В., Попов В.Б. Коррекция токсического поражения печени стволовыми клетками. *Токсикологический вестник*. 2020; (4): 21-26. <https://doi.org/10.36946/0869-7922-2020-4-21-26>.
8. Айрапетов Г.А., Загородий Н.В., Воронников А.А. Экспериментальный метод замещения костно-хрящевых дефектов суставов (ранние результаты). *Медицинский вестник Юга России*. 2019; 10(2): 71-76.
9. Ball L.M., Bernardo M.E., Roelofs H., Lankester A., Cometa A., Egeler M.R., et al. Co-transplantation of ex vivo-expanded mesenchymal stem cells accelerates lymphocytes recovery and may reduce the risk of graft failure in haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2007; 10: 2764-2767.
10. Le Blanc K., Samuelsson H., Gustafsson B., Remberger M., Sundberg B., Arvidson J., et al. Transplantation of mesenchymal stem cells to enhance engraftment of hematopoietic stem cells. *Leukemia*. 2007; 21(8): 1733-1738.
11. Wyse R.D. Use of genetically modified mesenchymal stem cells to treat neurodegeneration diseases. *Int. J. Mol. Sci*. 2014; 15: 1719-1745.
12. Jo C.H., Lee Y.G., Shin W.H., Kim H., Chai J.W., Jeong E.C., et al. Intra-articular injection of mesenchymal stem cells for the treatment of osteoarthritis of the knee: a proof-of-concept clinical trial. *Stem Cells*. 2014; 32: 1254-1266.
13. Huebner K., Frank R.M., Getgood A. Ortho-Biologics for Osteoarthritis. *Clinics in Sports Medicine*. 2019; 38(1): 123-141.
14. Golchin A., Tahereh Z. F., Khojasteh A., Soleimanifar F., Ardehshirylajimi A. The Clinical Trials of Mesenchymal Stem Cell Therapy in Skin Diseases: An Update and Concise Review. *Current Stem Cell Research & Therapy*. 2019; 14(1): 22-33.
15. Li M., Ma J., Gao Y., Yang L. Cell sheet technology: a promising strategy in regenerative medicine. *Cytotherapy*. 2019; 21(1): 3-16.
16. Konno T., Akito K., Kurita K., Ito Y. Formation of embryoid bodies by mouse embryonic stem cells on plastic surfaces. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2005; 100(1): 88 - 93.
17. Domini M., Le Blanc K., Mueller L., Sliaper-Cortenbach I., Marini Fc., Krause Ds., et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006; 8(4): 315-317.
18. Мужикян А.А., Макарова М.Н., Гушин Я.А. Особенности гистологической обработки органов и тканей лабораторных животных. СПб: Международный вестник ветеринарии. 2014; 2: 103-9.
19. Kinnaird T., Stabile E., Burnett M.S., Lee C.W., Barr S., Fuchs S., Epstein S.E. Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circ Res*. 2004; 94: 678-685.
20. Stagg J., Galipeau J. Mechanisms of Immune Modulation by Mesenchymal Stromal Cells and Clinical Translation. *Curr. Mol. Med*. 2013; 13(5): 856-867.
21. Praveen K.L., Kandoi S., Misra R., Vijayalakshmi S., Rajagopal K., Verma R.S. The mesenchymal stem cell secretome: A new paradigm towards cell-free therapeutic mode in regenerative medicine. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2019; 46: 1-9. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2019.04.002.

REFERENCES:

1. On the state of sanitary and epidemiological well-being of the population in the Russian Federation in 2019: State report. - M.: Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare. 299 ;2020 (in Russian).
2. Official website of Russian statistics. URL: <https://gks.ru/folder/13721> (in Russian).
3. Antonenko O.M. Toxic liver damage: ways of pharmacological correction. *Polyclinic MC*. 51-45 ;(2);6 ;2013 (in Russian).
4. Stravitz R.T., Lee W.M. Acute liver failure. *Lancet*. 881-869 :394 ;2019.
5. Esquer F., Esquer M., Parrau D., Carpio D., Yañez A., Cong P. Systemic administration of multipotent mesenchymal stromal cells reverts hyperglycemia and prevents nephropathy in type I diabetic

- mice. *Biol. Blood Marrow Transplant.* ;2008 40-631 :14.
6. Wang J., Wan H. Mesenchymal stromal cells as a therapeutic treatment for ischemic stroke. *Neuroscience bull.* ;2014 35-524 :30.
7. Protasova G.A., Shabasheva L.V., Popov V.B. Stem cell correction of toxic liver lesions. *Toxicological Review.* (4) ;2020 26-21. <https://doi.org/10.36946/26-21-4-2020-7922> (in Russian).
8. Airapetov G.A., Zagorodiy N.V., Vorotnikov A.A. An experimental method for the replacement of osteochondral defects of the joints (early results). *Medical Bulletin of the South of Russia.* 76-71 : (2)10 ;2019 (in Russian).
9. Ball L.M., Bernardo M.E., Roelofs H., Lankester A., Cometa A., Egeler M.R., et al. Co-transplantation of ex vivo-expanded mesenchymal stem cells accelerates lymphocytes recovery and may reduce the risk of graft failure in haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Blood.* 2767-2764 :10 ;2007.
10. Le Blanc K., Samuelsson H., Gustafsson B., Remberger M., Sundberg B., Arvidson J., et al. Transplantation of mesenchymal stem cells to enhance engraftment of hematopoietic stem cells. *Leukemia.* 1738-1733 ;(8)21 ;2007.
11. Wyse R.D. Use of genetically modified mesenchymal stem cells to treat neurodegeneration diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 1745-1719 :15 ;2014.
12. Jo C.H., Lee Y.G., Shin W.H., Kim H., Chai J.W., Jeong E.C., et al. Intra-articular injection of mesenchymal stem cells for the treatment of osteoarthritis of the knee: a proof-of-concept clinical trial. *Stem Cells.* 1266-1254 :32 ;2014.
13. Huebner K., Frank R.M., Getgood A. Ortho-Biologics for Osteoarthritis. *Clinics in Sports Medicine.* 141-123 : (1)38 ;2019.
14. Golchin A., Tahereh Z. F., Khojasteh A., Soleimanifar F., Ardeshtyrajimi A. *The Clinical Trials of Mesenchymal Stem Cell Therapy in Skin Diseases: An Update and Concise Review. Current Stem Cell Research & Therapy.* 33-22: (1)14 ;2019.
15. Li M., Ma J., Gao Y., Yang L. Cell sheet technology: a promising strategy in regenerative medicine. *Cytotherapy.* ;2019 16-3: (1)21.
16. Konno T., Akito K., Kurita K., Ito Y. Formation of embryoid bodies by mouse embryonic stem cells on plastic surfaces. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* 93 - 88 : (1)100 ;2005.
17. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini Fc., Krause Ds., et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 317-315 : (4)8 ;2006.
18. Muzhikyan A.A., Makarova M.N., Gushchin Ya.A. Features of histological processing of organs and tissues of laboratory animals. *SPb: International Veterinary Bulletin.* 9-103 :2 ;2014 (in Russian).
19. Kinnaird T., Stabile E., Burnett M.S., Lee C.W., Barr S., Fuchs S., Epstein S.E. Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circ Res.* ;2004 685-678 :94.
20. Stagg J., Galipeau J. Mechanisms of Immune Modulation by Mesenchymal Stromal Cells and Clinical Translation. *Curr. Mol. Med.* 867-856 : (5)13 ;2013.
21. Praveen K.L., Kandoi S., Misra R., Vijayalakshmi S., Rajagopal K., Verma R.S. The mesenchymal stem cell secretome: A new paradigm towards cell-free therapeutic mode in regenerative medicine. *Cytokine & Growth Factor Reviews.* 9-1 :46 ;2019. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2019.04.002.

E.G. Trapeznikova¹, V.B. Popov¹, A.S. Radilov¹, V.V. Shilov²

MORPHOMETRIC ASSESSMENT OF REGENERATIVE PROCESSES IN THE LIVER OF RATS IN ACUTE TOXIC HEPATITIS AND MESENCHYMAL STEM CELL TRANSPLANTATION

¹Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology, Federal Medical Biological Agency, 188663, G/P Kuzmolovsky, Vsevolozhsky District, Leningrad Region, Russian Federation

²North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, 191015, Sankt Petersburg, Russian Federation

An experimental simulation of acute toxic hepatitis in laboratory animals (sexually mature male «Wistar» rats) was carried out using a single intragastric administration of an oil solution of carbon tetrachloride (CCl₄) at a dose of 1500 mg/kg. It is histologically confirmed that CCl₄ causes extensive centrilobular necrotic changes in the liver parenchyma, impaired carbohydrate and protein metabolism in hepatocytes, followed by the development of fatty degeneration of the organ.

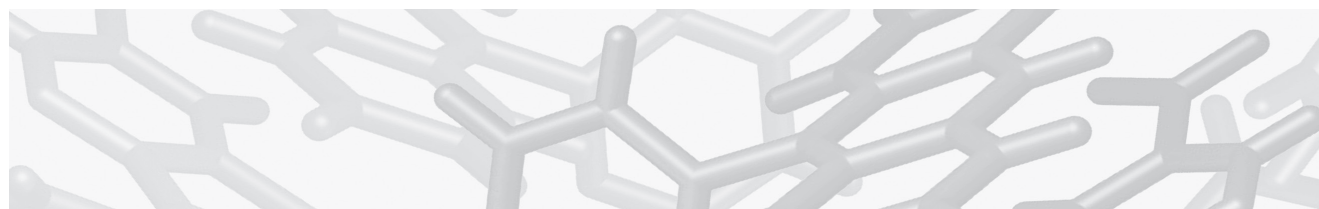
In order to study the therapeutic potential of cell cultures for the correction of lesions in acute toxic hepatitis, a line of multipotent mesenchymal stem cells (MMSCs) differentiated from mouse embryonic tissues was used. The animals were divided into 2 experimental groups: 1st group (control) – the introduction of CCl₄ at a dose of 1500 mg/kg; 2nd group – the introduction of CCl₄ at a dose of 1500 mg/kg, after 8 hours, an intravenous injection of a suspension containing MMSC in the amount of 1,5 million per animal.

In the course of the study, the migration of transplanted MMSCs of the mouse into the affected tissue of rat liver was proved. The positive therapeutic effect of transplanted MMSCs in acute toxic hepatitis was revealed, manifested in a decrease in necrotic, inflammatory and dystrophic processes in the liver parenchyma. According to morphometric analysis, the injection of MMSC suspension led to a statistically significant decrease in the area of inflammatory infiltrates on days 3 and 5 and a decrease in the degree of fatty degeneration on day 7 after exposure to CCl₄. The results obtained indicate the high therapeutic potential of MMSCs for the correction of acute toxic liver lesions.

Keywords: morphometric research, tetrachloromethane, acute toxic hepatitis, multipotent mesenchymal stem cells, toxic damage therapy.

Quote: E.G. Trapeznikova, V.B. Popov, A.S. Radilov, V.V. Shilov. Morphometric assessment of regenerative processes in the liver of rats in acute toxic hepatitis and mesenchymal stem cell transplantation. *Toxicological Review.* 2021; 1:14-19.

Переработанный материал поступил в редакцию 20.01.2021 г.



УДК 615.9:547.854.4

DOI: 10.36946/0869-7922-2021-1-20-26.

ДОЗОЗАВИСИМЫЙ ХАРАКТЕР НАРУШЕНИЯ ФУНКЦИИ КРОВЕТВОРНОЙ И ИММУННОЙ СИСТЕМ, ПРОДУКЦИИ НЕКОТОРЫХ ГОРМОНОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ОТРАВЛЕНИИ УРАНИЛОМ АЦЕТАТОМ ДИГИДРАТОМ

К.И. Стосман^{1,2}, К.В. Сивак²,
Т.А. Рассоха², Т.Н. Саватеева-
Любимова²

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУН ИТ ФМБА России), 192019, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

²Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А.Смородинцева» Минздрава России) 197376, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

В работе представлены результаты экспериментального исследования дозозависимого характера функциональных изменений систем организма при хроническом введении уранила ацетат дигидрата в дозах 0,5 и 5,0 мг/кг по элементу в течение 18 недель. Исследование выполнено на 45 беспородных крысах самцах. Показано, что уранила ацетат дигидрат в дозе 0,5 мг/кг не оказывал значимого влияния на гематологические показатели, выявлена активация бактерицидной активности нейтрофилов, снижение иммунорегуляторного индекса, увеличение концентрации в крови фактора некроза опухоли (TNF- α). Токсикант, введенный крысам в дозе 5 мг/кг, приводил к снижению абсолютного числа эритроцитов, гемоглобина, гематокрита, тромбоцитов, выходу в кровь миелоцитов, базофилии, моноцитозу, появлению клеток лейколиза и плазматизации лимфоцитов. Со стороны иммунной системы установлено усиление биоцидной способности нейтрофильных гранулоцитов, продукции TNF- α , увеличение количества CD8+-клеток, редукция соотношения CD4+/CD8+. Уранила ацетат дигидрат оказал дозозависимое влияние только на количество цитотоксических Т-лимфоцитов, Т-клеток с фенотипом CD4+CD8+, на иммунорегуляторный индекс, на уровень TNF- α . Гипергликемия и глюкозурия носили дозозависимый характер. Увеличение глюкозы в крови и моче свидетельствовало о нарушении углеводного обмена и функции почек. Наблюдалось снижение концентрации тироксина, тестостерона и повышение уровня инсулина. Уранила ацетат дигидрат приводил к развитию инсунорезистентности. Уровень гормонов не зависел от вводимой животным дозы токсиканта.

Ключевые слова: уранила ацетат дигидрат, гематопоез, гормоны, иммунная система.

Цит: К.И. Стосман, К.В. Сивак, Т.А. Рассоха, Т.Н. Саватеева-Любимова. Дозозависимый характер нарушения функции кроветворной и иммунной систем, продукции некоторых гормонов при экспериментальном отравлении уранилом ацетатом дигидратом. Токсикологический вестник. 2021; 1:20-26.

Введение. Соединения урана, в частности уранила ацетат дигидрат (УАД), являются не только альфа-излучающим радионуклидом, но и политропным токсическим веществом [1]. Можно предположить, что комплекс радиационных эф-

фектов и химической токсичности УАД существенно повышает риск возникновения заболеваний, в том числе при накоплении в организме. К тому же существует ряд признаков, которые указывают на возможный синергизм этих двух

Стосман Кира Иосифовна (Stosman Kira Iosifovna), кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биохимической токсикологии и фармакологии ФГБУН ИТ ФМБА России, старший научный сотрудник лаборатории безопасности лекарственных средств ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, labtox6@rambler.ru;

Сивак Константин Владимирович (Sivak Konstantin Vladimirovich), кандидат биологических наук, заведующий отделом доклинических исследований ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, kvsivak@gmail.com;

Рассоха Татьяна Анатольевна (Rassokha Tatyana Anatolievna), кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории безопасности лекарственных средств ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, tat.rassokha2012@yandex.ru;

Саватеева-Любимова Татьяна Николаевна (Savateeva-Lubimova Tatyana Nikolaevna), доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории безопасности лекарственных средств ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, drugs_safety@mail.ru.

типов воздействия [2]. Соединения обедненного урана (ОУ) приводят к функциональному нарушению деятельности ряда органов и систем – печени, почек, костного мозга, центральной нервной, иммунной, эндокринной систем и др. [3 – 5]. В экспериментах, проведенных на крысах и кроликах, отмечено отсутствие вредного воздействия ОУ на кровь при его внутрижелудочном поступлении из-за малой абсорбции из кишечника [6, 7]. Исследования состояния здоровья ветеранов, участвовавших в войне в Персидском заливе, показало, что несмотря на то, что в моче определялись повышенные концентрации урана, гематологические показатели находились в пределах нормальных значений [8]. Не выявлено существенного влияния длительных экспозиций соединений ОУ на эндокринную систему. В экспериментах на крысах не было обнаружено изменений уровня стероидных гормонов и экспрессии генов, кодирующих белки, регулирующие их синтез [9, 10]. В тоже время, было показано, что в плазме крови крыс при хроническом поступлении с питьевой водой уранила нитрат гексагидрата в концентрации 120 мг/л снижался уровень тестостерона [11]. У рабочих, имеющих вредный профессиональный стаж на урановых шахтах более 10 лет, также обнаружено уменьшение концентрации этого гормона [12]. Данные о влиянии ОУ на иммунную систему несколько противоречивы. В ряде работ показано снижение уровня IL-6 и TNF- α у крыс после низкодозового воздействия токсиканта в течение 30 дней [13, 14]. В тоже время, есть сведения об увеличении этих цитокинов в крови [15]. Некоторые исследователи не выявили значимых отклонений в иммунологических показателях у крыс при хроническом введении уранила нитрат гексагидрата с питьевой водой [6]. В экспериментах на мышах показано, что уран-индуцированный апоптоз и некроз в перитонеальных макрофагах и Т-клетках селезенки зависел от уровня дозы токсиканта. При более низких (нецитотоксичных) концентрациях ОУ индуцировал неспецифическую дифференцировку Т-клеток [16]. У людей, подвергшихся воздействию ОУ, наблюдались различные изменения иммунологических показателей: снижена активность НК-клеток, пролиферативная активность лимфоцитов, повышено количество В-клеток [17]. При обследовании лиц, проживающих вблизи урановых хвостохранилищ, установлена персистенция вирусной нагрузки в организме, снижение общего количества Т-лимфоцитов и дисбаланс их субпопуляций [18]. Некоторые исследователи не выявляли никаких существенных отклонений изучаемых показателей от нормы [8].

Целью работы явилось изучить дозозависимый характер нарушения функции кроветворной и иммунной систем, продукции некоторых гормо-

нов при экспериментальном отравлении уранилом ацетатом дигидратом.

Материалы и методы исследования. Экспериментальное исследование проведено в соответствии с этическими принципами обращения с лабораторными животными [19]. Работа выполнена на 45 беспородных крысах с массой тела 160-190 г, полученных из ФГУП «Питомник лабораторных животных «Рапполово» РАН (Ленинградская область). Животные были разделены на группы: 1 – особи, которым вводили плацебо (воду очищенную, 1 мл/кг), n=15; 2 – особи, которым вводили УАД в дозе 0,5 мг/кг/сут по элементу, n=15; 3 – особи, которым вводили УАД в дозе 5,0 мг/кг/сут по элементу, n=15. Уранила ацетат дигидрат вводили 1 раз в сутки внутрижелудочно через атравматический металлический зонд в течение 18 недель.

Анализ крови выполняли на гематологическом анализаторе (Abacus Junior Vet, Австрия). Микроскопию мазков проводили с помощью наборов красителей (НПФ «Абрис», Россия). Для количественной оценки уровня Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов использовали меченые мышиные моноклональные антитела против CD45, CD3, CD4 и CD8 антигенов крыс (BD Pharmingen, США). Продукцию цитокинов определяли с помощью коммерческих наборов (BD, США; Bender MS, Австрия) методом твердофазного иммуноферментного анализа. Бактерицидную активность нейтрофилов оценивали согласно методу [20]. Концентрацию глюкозы определяли с помощью коммерческих наборов (Randox, Великобритания) на автоматическом биохимическом анализаторе KeyLab (BPC+BioSed s.r.l., Италия). Суточную мочу собирали в мочеприемник обменной клетки (Techniplast Gazzada, Италия). Анализ тест-полосками проводили с помощью 10EA-стрипов и полуавтоматической системы Aution Eleven (Arkray, Япония). Концентрацию изотопа урана ^{238}U измеряли методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой (АЭС-ИСП) [21]. Определение уровня гормонов проводили с помощью коммерческих наборов (DVC и Peninsula Laboratories, LLC, США) методом твердофазного иммуноферментного анализа. Индексы инсулинорезистентности CARO и НОМО-IR определяли по формулам:

$$\text{Индекс CARO} = \frac{\text{Глюкоза в крови, ммоль/л}}{\text{Инсулин, мкМЕ/мл}}$$

Индекс НОМО-IR=

$$\frac{\text{Глюкоза в крови, ммоль/л} \times \text{Инсулин, мкМЕ/мл}}{22,5}$$

Обработку результатов исследования выполняли с использованием пакета статистических программ «GraphPadPrism 6.0» (США). Проверка на

нормальность распределения проводилась методом Шапиро-Уилка. Для сравнения использовали непараметрический критерий Краскела-Уоллиса, Данна-Бонферрони и считали значимыми при уровне $p < 0,05$. Зависимость между переменными оценивали с помощью коэффициента корреляции Спирмена (R).

Результаты и обсуждение. У животных, которым вводили УАД в дозе 0,5 мг/кг, никаких значимых изменений гематологических показателей не обнаружено, что свидетельствует о выраженных компенсаторных возможностях гемопоэза (табл. 1).

С увеличением дозы токсиканта (5 мг/кг) наблюдалось угнетение миелопоэза по трем росткам кроветворения (тромбоцитарному, эритроцитарному и миелоцитарному), что выражалось в виде уменьшения абсолютного числа эритроцитов, гемоглобина (нормоцитарная нормохромная анемия), гематокрита, тромбоцитов, базофилии, моноцитоза, выходе в кровь миелоцитов, появлении клеток лейколиза и плазматических клеток. Одной из причин снижения уровня гемоглобина и эритроцитов может быть сосудистый гемолиз, а одним из возможных механизмов гемолиза и анемии – индукция окислительного стресса. Дозозависимое увеличение числа мононуклеаров развивалось за счет повышения абсолютно-

го количества клеток различных субпопуляций лейкоцитов (лимфоцитов, моноцитов), причем суммарный уровень лейкоцитов оставался нормальным. Появление миелоцитов (молодых незрелых клеток), увеличение абсолютного количества нейтрофилов и моноцитов можно отнести к лейкомоидным реакциям, что свидетельствует о значительном раздражении костного мозга и ускорении лейкопоэза под воздействием токсиканта. Персистенция плазматических клеток в периферической крови в норме наблюдается редко, и их наличие может быть проявлением реактивного процесса в ответ на поступление в организм УАД. Общее число лимфоцитов у животных из обеих опытных групп существенно не отличалось от значений в норме.

Все выявленные изменения клеточного состава крови при введении УАД в дозе 5 мг/кг можно идентифицировать как признаки поражения структур гемопоэза, которые, вероятно, связаны с цитотоксическим влиянием УАД на кроветворные органы и с нарушениями в работе системы иммунитета.

Иммунная система обладала более высокой чувствительностью к изучаемому фактору, чем система крови. При хроническом воздействии УАД уже в дозе 0,5 мг/кг отмечалась тенденция к снижению относительного количества CD4+

Таблица 1

Влияние хронического воздействия УАД на гематологические показатели

Изучаемые показатели	Экспериментальная группа, $M \pm m$		
	Плацебо	УАД, 0,5 мг/кг	УАД, 5,0 мг/кг
Гемоглобин, г/л	147,0±1,4	146,0±1,4	89,3±1,5*^
Эритроциты, $10^{12}/л$	6,07±0,04	6,13±0,14	3,71±0,08*^
Гематокрит, %	33,9±0,9	31,9±2,4	22,0±0,7*^
Тромбоциты, $10^9/л$	700,5±7,4	691,6±9,9	354,4±13,7*^
Лейкоциты, $10^9/л$	7,46±0,37	7,32±0,14	8,05±0,35
Сегментоядерные лейкоциты, $10^9/л$	0,81±0,05	0,81±0,04	0,52±0,09*^
Моноциты, $10^9/л$	0,18±0,03	0,19±0,03	0,39±0,06*^
Лимфоциты, $10^9/л$	6,36±0,53	6,46±0,24	6,91±0,45
Базофилы, $10^9/л$	0,00±0,00	0,01±0,01	0,08±0,02*
Плазматические клетки, %	0,00±0,00	0,20±0,13	0,70±0,26*
Клетки лейколиза, %	0,00±0,00	0,00±0,00	0,80±0,33*^

Примечания: Здесь и в таблицах 2-4 * – различия между показателями значимы по сравнению с группой плацебо, $p < 0,05$; ^ – различия между показателями значимы по сравнению с группой животных, которым вводили УАД в дозе 0,5 мг/кг, $p < 0,05$

Т-лимфоцитов, к увеличению CD8+ цитотоксических Т-клеток (табл. 2).

Статистически значимых изменений в содержании субпопуляций Т-клеток не наблюдалось. В тоже время, иммунорегуляторный индекс (ИРИ), отражающий фазу развития иммунного воспаления, был существенно ниже, чем в норме. Отмечалось увеличение продукции TNF- α , который является одним из ключевых цитокинов регуляции иммунных процессов. Выявлена активация бактерицидной активности нейтрофилов, как спонтанной, так и стимулированной зимозаном. Изменения показателей кислородзависимой биоцидности свидетельствуют об активном вовлечении нейтрофильных гранулоцитов в воспалительный процесс, инициируемый хроническим воздействием токсикантом.

Наиболее выраженные изменения отмечены у животных, которым вводили УАД в дозе 5 мг/кг. Наблюдалось снижение ИРИ,

которое происходило за счет уменьшения числа CD4+-клеток и повышения содержания CD8+-лимфоцитов. В кровотоке регистрировалось значимое увеличение незрелых форм Т-лимфоцитов с фенотипом CD4+CD8+. Выявлена позитивная корреляция между уровнем 238U в моче и содержанием в крови Т-лимфоцитов с фенотипом CD8+ у крыс, которым вводили УАД в дозе 5 мг/кг ($R=0,704$). Установлено дозозависимое увеличение сывороточного уровня TNF- α (в 6-12 раз по сравнению с группами №1 и №2, соответственно). Концентрация IL-1 β в целом в группе, хотя статистически значимо и не изменялась по сравнению с контролем, но у некоторых животных этот показатель был ниже нормы. Наблюдалось усиление фагоцитарно-метаболической активности нейтрофилов, которое может быть связано с взаимодействием накапливаемых под воздействием УАД метаболитов с различными радикалами

Таблица 2

Влияние хронического воздействия УАД на иммунологические показатели крови крыс

Исследуемые показатели	Экспериментальная группа, M \pm m		
	Плацебо	УАД, 0,5 мг/кг	УАД, 5,0 мг/кг
CD4+, %	37,09 \pm 2,10	34,96 \pm 1,79	34,32 \pm 2,01
CD8+, %	40,97 \pm 4,14	50,49 \pm 2,42	61,91 \pm 2,97* \wedge
CD4+CD8+, %	1,18 \pm 0,11	1,23 \pm 0,26	1,91 \pm 0,12* \wedge
Иммунорегуляторный индекс	0,99 \pm 0,11	0,69 \pm 0,02*	0,57 \pm 0,05*
IL-1 β , пг/мл	26,90 \pm 2,70	33,10 \pm 5,60	15,20 \pm 8,80
TNF- α , пг/мл	3,10 \pm 0,68	15,92 \pm 6,01*	35,91 \pm 5,09* \wedge
Стимулированный НСТ-тест, оп.пл.	0,52 \pm 0,05	0,78 \pm 0,04*	0,83 \pm 0,04*
Спонтанный НСТ-тест, оп.пл.	0,37 \pm 0,02	0,49 \pm 0,02*	0,51 \pm 0,02*
Индекс стимуляции, ед.изм.	1,40 \pm 0,08	1,61 \pm 0,04*	1,64 \pm 0,07*

Таблица 3

Влияние хронического воздействия УАД на уровень глюкозы в крови и моче крыс

Исследуемые показатели	Экспериментальная группа, M \pm m		
	Плацебо	УАД, 0,5 мг/кг	УАД, 5,0 мг/кг
Глюкоза крови, ммоль/л	4,31 \pm 0,53	5,83 \pm 0,30*	9,52 \pm 0,47* \wedge
Глюкоза мочи, ммоль/л	0,12 \pm 0,08	0,92 \pm 0,45	5,43 \pm 2,30* \wedge

на мембране макрофагов и микрофагов, индукцией функции ферментов тканевого дыхания митохондрий, эстераз нейтрофилов.

У животных из обеих опытных групп установлено дозозависимое увеличение глюкозы в крови (табл. 3). Наличие гипергликемии свидетельствует о нарушении углеводного обмена. Снижение утилизации глюкозы тканями может происходить, в том числе, и под влиянием гормональных антагонистов инсулина: соматотропина, глюкагона, адреналина, глюкокортикоидов, тироксина и др. Возможно, развитие умеренной гипергликемии имело связь, в том числе, и с общими эндокринными изменениями, которые наблюдались у крыс на фоне введения УАД (табл. 4).

Глюкозурия также носила дозозависимый характер и являлась следствием нарушения углеводного обмена. Известно, что уран ингибирует натрий-зависимый транспорт глюкозы и фосфата, а также гексокиназу в почках [22]. С другой стороны, мы наблюдали в нашем опыте гиперинсулинемию как компенсаторную реакцию инсулярного аппарата поджелудочной железы в ответ на воздействие токсиканта и повышение уровня глюкозы в крови.

В крови крыс, которым в течение 18-ти недель вводили УАД, наблюдалось снижение уровня свободного тироксина (в 1,3 – 1,6 раза), тестостерона (почти в 4 раза) и повышение инсулина (почти в 6 раз) (табл. 4). Выявленные изменения не носили дозозависимого характера. Концентрация кортизола и Т3 оставалась на уровне нормы. Зарегистрированные изменения свидетельствуют о каскаде гормональных нарушений с гипотиреозом, инсулинорезистентностью (как при метаболическом синдроме у человека) и угнетением синтеза полового гормона тестостерона в ответ на хроническое отравление УАД.

У животных после хронического введения УАД показатель НОМА-IR, характеризующий печеночную инсулинорезистентность, увеличивался, а индекс CARO – снижался (рис.).

Корреляционный анализ позволил выявить положительную взаимосвязь между индексом НОМА-IR и уровнем TNF-α (R=0,7381). Подобные позитивные связи описаны у пациентов с абдоминальным ожирением [23]. Выявленная инсулинорезистентность может быть следствием нарушения рецепторных и/или пострецепторных механизмов передачи инсулинового сигнала.

Таблица 4

Влияние хронического воздействия УАД на концентрацию гормонов в сыворотке крови крыс

Исследуемые показатели	Экспериментальная группа, М±m		
	Плацебо	УАД, 0,5 мг/кг	УАД, 5,0 мг/кг
Т3, нг/мл	0,91±0,07	0,81±0,06	0,92±0,01
Т4, нг/дл	0,52±0,03	0,41±0,05*	0,32±0,02*
Кортизол, мкг/дл	4,78±0,37	3,59±0,49	4,66±0,60
Тестостерон, пг/мл	1,03±0,2	0,37±0,06*	0,41±0,13*
Инсулин, нг/мл	0,03±0,02	0,17±0,05*	0,22±0,05*

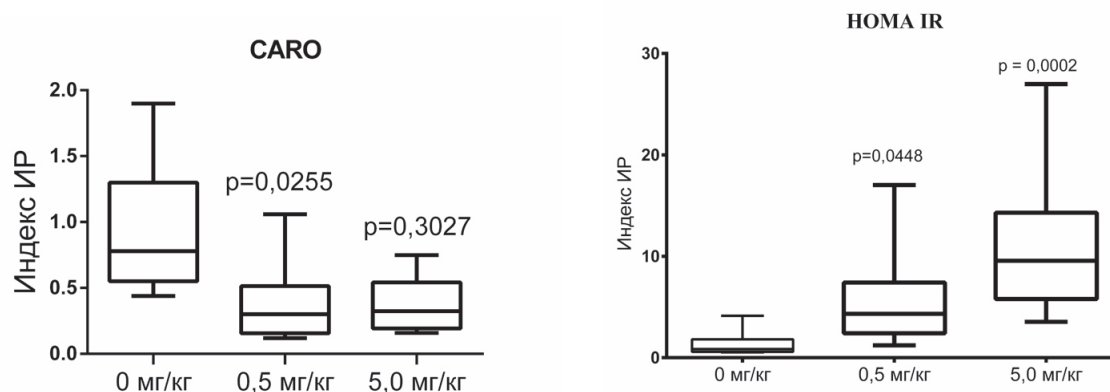


Рис. Индексы инсулинорезистентности (ИР) CARO и НОМА-IR у крыс после хронического введения уранила ацетат дигидрата

ла (снижение тирозинкиназной активности инсулинового рецептора, нарушение регуляции активности фосфоинозитид-3-киназы, встраивания переносчика GLUT4 в мембраны клеток инсулинчувствительных тканей, секреции адипоцитокинов) [24]. Существует мнение, что усиление инсулинорезистентности при тиреоидной недостаточности, которое наблюдалось и в нашей работе, обусловлено в первую очередь изменениями чувствительности к инсулину печеночной ткани, что проявляется отсутствием ингибирующего влияния инсулина на глюконеогенез [25].

Заключение. Уранила ацетат дигидрат при хроническом введении в течение 18 недель оказал дозозависимое влияние на гемопоэз. Доза токсиканта 0,5 мг/кг не приводила к каким-либо изменениям изучаемых показателей. В крови животных, которым вводили в 10 раз превышающую дозу УАД (5 мг/кг), наблюдалось угнетение миелопоэза по трем росткам кроветворения (тромбоцитарному, эритроцитарному и миелоцитарному): снижение абсолютного числа эритроцитов, гемоглобина, гематокрита, тромбоцитов, выходе в кровь миелоцитов, базофилии, моноцитозу,

появление клеток лейколиза и плазматических клеток. Гематотоксичность при хроническом воздействии УАД проявлялась также развитием гипопластической (нормохромной) анемии.

Со стороны системы иммунитета токсикант оказал дозозависимое влияние только на количество цитотоксических Т-лимфоцитов, Т-клеток с фенотипом CD4+CD8+, на иммунорегуляторный индекс и на уровень провоспалительного цитокина TNF- α . Выявлена позитивная корреляция между уровнем урана ^{238}U в моче и содержанием в крови CD8+ Т-лимфоцитов, между индексом НОМА-IR и концентрацией TNF- α . У всех опытных животных наблюдалась активация бактерицидной активности нейтрофилов.

Уранила ацетат дигидрат при хроническом введении приводил к развитию умеренной гипергликемии и глюкозурии, которые имели дозозависимый характер и свидетельствовали о нарушении углеводного обмена и функции почек. Отравление УАД привело к каскаду нарушений со стороны эндокринной системы: к повышению уровня инсулина, снижению синтеза тироксина и тестостерона. Изменения уровня гормонов не зависели от дозы вводимого животным токсиканта.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Briner W. The toxicity of depleted uranium. *Int. J. Environ Res. Public Health*. 2010; 7(1):303-13.
2. Ушаков И.Б., Афанасьев Р.В., Березин Г.И., Зувев В.Г. Обедненный уран: радиационные и экологические аспекты безопасности. Военно-медицинский журнал. 2003;324 (4): 56-8.
3. Стосман К.И., Сивак К.В., Саватеева-Любимова Т.Н. Нарушения в функционировании иммунной системы как следствие пролонгированного низкодозового воздействия обедненным ураном. Медико-биологические и социально-психологические проблемы безопасности в чрезвычайных ситуациях. 2018; 3:73-9.
4. Poisson C., Stefani J., Manens L., Delissen O., Suhard D., Tessier C., Dublineau I.&Y. Gueguen. Chronic uranium exposure dose-dependently induces glutathione in rats without any nephrotoxicity. *Free Radical Research*. 2014; 48(10): 1218-31.
5. Федоров В.П., Асташова А.Н. Церебральные эффекты боеприпасов с обедненным ураном. Экологические проблемы обеспечения безопасности при чрезвычайных ситуациях природного и техногенного характера. 2017; 1:305-9.
6. Gilman A.P., Villeneuve D.C., Secours V.E. et al. Uranyl nitrate: 28-day and 91-day toxicity studies in the Sprague-Dawley rat. *Toxicol. Sci*. 1998; 41(1):117-28.
7. Gilman A.P., Villeneuve D.C., Secours V.E. et al. Uranyl nitrate: 91-day toxicity studies in the New Zealand white rabbit. *Toxicol. Sci*. 1998; 41(1):129-37.
8. McDiarmid M.A., Engelhardt S., Oliver M. et al. Health effects of depleted uranium on exposed gulf war veterans: a 10-year follow-up. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*. 2004; 67: 277-96.
9. Berradi H., Bertho J.-M., Dudoignon N. Renal anemia induced by chronic ingestion of depleted uranium in rats. *Toxicol. Science*. 2008; 103 (2): 397-408.
10. Grignard E., Gueguen Y., Grison S. et al. Contamination with depleted or enriched uranium differently affects steroidogenesis metabolism in rat. *Int. J. Toxicol*. 2008; 27(4): 323-8.
11. Legendrea A., Christelle E., Ramambasona C., Manensa L., Souidia M., Froment P., Tacka K. Endocrine effects of lifelong exposure to low-dose depleted uranium on testicular functions in adult rat. *Toxicology*. 2019; 368-369: 58-68.
12. Zaire R., Notter M., Riedel W., Thiel E. Unexpected rates of chromosomal instabilities and alteration of hormone levels in Namibian uranium miners. *Radiat Res*. 1997;147(5): 579-84.
13. Hao Y., Ren J., Liu J., Luo S., Ma T., Lim R., Su Y. The protective role of zinc against acute toxicity of depleted uranium in rats. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 2012; 111: 402-10.
14. Hao Y., Ren J., Liu J., Yang Z., Liu C., Li R., Su Y. Immunological changes of chronic oral exposure to depleted uranium in mice. *Toxicology*. 2013; 5 (309): 81-90.
15. Wan B., Fleming J.T., Schultz T.W., Saylor G.S. In Vitro Immune Toxicity of Depleted Uranium: Effects on Murine Macrophages, CD4+ T Cells, and Gene Expression Profiles. *Environmental Health Perspectives*. 2006; 114 (1): 85-91.
16. Kun Li, Yi Shui Chen, Xiao Liang Li, Shu Jie Lei, Qing Feng Chen, Jian Xiang Liu, Quan Fu Sun. Alteration of cytokine profiles in uranium miners exposed to long-term low dose ionizing radiation. *The Scientific World Journal*. 2014. Electronic publication.
17. Lourenco J., Pereira R., Pinto E. et al. Biomonitoring a human population inhabiting nearby a deactivated uranium mine. *Toxicology*. 2013; 305: 89-98.
18. Тухватшин П.П., Койбагарова А.А., Исупова А.А. Проблемы радиобиологии в Кыргызстане. Медицина Кыргызстана. 2014; 2:158-61.
19. Директива 2010/63/EU европейского парламента и совета европейского союза по охране животных, используемых в научных целях. СПб., 2012.
20. Chereshev V.A., Shilov Ju.I., Cheresheva M.V., Platova L.A., Badanova O.N., Osotov S.V., Ponomareva T.B. Effects of polyoxidonium on phagocytic cell functions. Experimental and clinical estimation of potential inclusion of polyoxidonium in complex therapy in penetrating eye injury. *Rus. J. Immunol*. 2000; 5 (1): 39-52.
21. Principles and methods for the assessment of nephrotoxicity associated with exposure to chemicals. EHC 119, EUR 13222. WHO, 1991 (in English).
22. Сивак К.В. Механизмы нефропатологии токсического генеза. Патогенез. 2019; 17(2): 16-29.
23. Драпкина О.М., Шифрина Ю.О. Некоторые молекулярные аспекты инсулинорезистентности. Артериальная гипертензия. 2010; 16 (5):436-40.
24. Бугрова С.А., Ершова Е.В., Ильин А.В. Адипоцитокины: резистин и фактор некроза опухоли- α у мужчин с абдоминальным ожирением. Ожирение и метаболизм. 2007; 4:30-3.
25. Пашенцева А.В., Вербовой А.Ф., Шаронова Л.А. Инсулинорезистентность в терапевтической клинике. Ожирение и метаболизм. 2017; 14(2):9-17.

REFERENCES:

1. Briner W. The toxicity of depleted uranium. *Int. J. Environ Res. Public Health*. 2010; 7(1): 303-13.
2. Ushakov I.B., Afanas'ev R.V., Berезin G.I., Zuev V.G. Depleted uranium: radiation and environmental safety aspects. *Military Medical Journal*. 2003; 324 (4): 56-8 (in Russian).
3. Stosman K.I., Sivak K.V., Savateeva-Lyubimova T.N. Disturbances in the functioning of the immune system as a consequence of a prolonged low dose effect by depleted uranium. *Medico-biological and Socio-psychological Problems of Safety in Emergency Situations*. 2018; 3:73-9 (in Russian).
4. Poisson C., Stefani J., Manens L., Delissen O., Suhard D., Tessier C., Dublineau I.&Y. Gueguen. Chronic uranium exposure dose-dependently induces glutathione in rats without any nephrotoxicity. *Free Radical Research*. 2014; 48(10): 1218-31.
5. Fedorov V.P., Astashova A.N. Cerebral effects of depleted uranium ammunition. *Environmental problems of ensuring safety in emergency situations of natural and technogenic nature*. 2017; 1:305-9 (in Russian).
6. Gilman A.P., Villeneuve D.C., Secours V.E. et al. Uranyl nitrate: 28-day and 91-day toxicity studies in the Sprague-Dawley rat. *Toxicol. Sci*. 1998; 41(1):117-28.
7. Gilman A.P., Villeneuve D.C., Secours V.E. et al. Uranyl nitrate: 91-day toxicity studies in the New Zealand white rabbit. *Toxicol. Sci*. 1998; 41(1):129-37.
8. McDiarmid M.A., Engelhardt S., Oliver M. et al. Health effects of depleted uranium on exposed gulf war veterans: a 10-year follow-up. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*. 2004; 67: 277-96.
9. Berradi H., Bertho J.-M., Dudoignon N. Renal anemia induced by chronic ingestion

- of depleted uranium in rats. *Toxicol. Science*. 2008; 103 (2): 397–408.
10. Grignard E., Gueguen Y., Grison S. et al. Contamination with depleted or enriched uranium differently affects steroidogenesis metabolism in rat. *Int. J. Toxicol.* 2008; 27(4): 323–8.
11. Legendrea A., Christelle E., Ramambasona C., Manensa L., Souidia M., Froment P., Tacka K. Endocrine effects of lifelong exposure to low-dose depleted uranium on testicular functions in adult rat. *Toxicology*. 2019; 368–369: 58–68.
12. Zaire R., Notter M., Riedel W., Thiel E. Unexpected rates of chromosomal instabilities and alteration of hormone levels in Namibian uranium miners. *Radiat Res.* 1997; 147(5): 579–84.
13. Hao Y., Ren J., Liu J., Luo S., Ma T., Lim R., Su Y. The protective role of zinc against acute toxicity of depleted uranium in rats. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 2012; 111: 402–10.
14. Hao Y., Ren J., Liu J., Yang Z., Liu C., Li R., Su Y. Immunological changes of chronic oral exposure to depleted uranium in mice. *Toxicology*. 2013; 5 (309): 81–90.
15. Wan B., Fleming J.T., Schultz T.W., Saylor G.S. In Vitro Immune Toxicity of Depleted Uranium: Effects on Murine Macrophages, CD4+ T Cells, and Gene Expression Profiles. *Environmental Health Perspectives*. 2006; 114 (1): 85–91.
16. Kun Li, Yi Shui Chen, Xiao Liang Li, Shu Jie Lei, Qing Feng Chen, Jian Xiang Liu, Quan Fu Sun. Alteration of Cytokine Profiles in Uranium Miners Exposed to Long-Term Low Dose Ionizing Radiation. *The Scientific World Journal*. 2014. Electronic publication.
17. Lourenco J., Pereira R., Pinto E. et al. Biomonitoring a human population inhabiting nearby a deactivated uranium mine. *Toxicology*. 2013; 305: 89–98.
18. Tukhvatschin R.R., Koibagarova A.A., Isupova A.A. Problems of radiobiology in Kyrgyzstan. *Medicine of Kyrgyzstan*. 2014; 2:158–61 (in Russian).
19. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of the European Union for the protection of animals used for scientific purposes. St. Petersburg, 2012. (in Russian).
20. Cheresheva V.A., Shilov Yu.I., Cheresheva M.V., Platova L.A., Badanina O.N., Osotov S.V., Ponomareva T.B. Effects of polyoxidonium on phagocytic cell functions. Experimental and clinical estimation of potential inclusion of polyoxidonium in complex therapy in penetrating eye injury. *Rus. J. Immunol.* 2000; 5 (1): 39–52.
21. Principles and methods for the assessment of nephrotoxicity associated with exposure to chemicals. EHC 119, EUR 13222. WHO, 1991.
22. Sivak K.V. Mechanisms of nephropathology of toxic genesis. *Pathogenesis*. 2019; 17(2): 16–29 (in Russian).
23. Drapkina O.M., Shifrina Yu.O. Some molecular aspects of insulin resistance. *Arterial hypertension*. 2010; 16 (5):436–40 (in Russian).
24. Butrova S.A., Ershova E.V., Il'in A.V. Adipocytokines: resistin and tumor necrosis factor- α in humans with abdominal obesity. *Obesity and metabolism*. 2007; 4:30–3 (in Russian).
25. Pashentseva A.V., Verbovoj A.F., Sharonova L.A. Insulin resistance in a therapeutic clinic. *Obesity and metabolism*. 2017; 14(2):9–17 (in Russian).

K.I. Stosman^{1,2}, K.V. Sivak², T.A. Rassokha², T.N. Savateeva-Lubimova²

DOSE-DEPENDENT CHARACTER OF DISTURBANCE OF HEMATOPOIETIC AND IMMUNE SYSTEMS FUNCTION, PRODUCTION OF SOME HORMONES IN EXPERIMENTAL URANIUM ACETATE DIHYDRATE EXPOSURE

¹Institute of Toxicology of the Federal Medical and Biological Agency, 192019, Saint Petersburg, Russian Federation

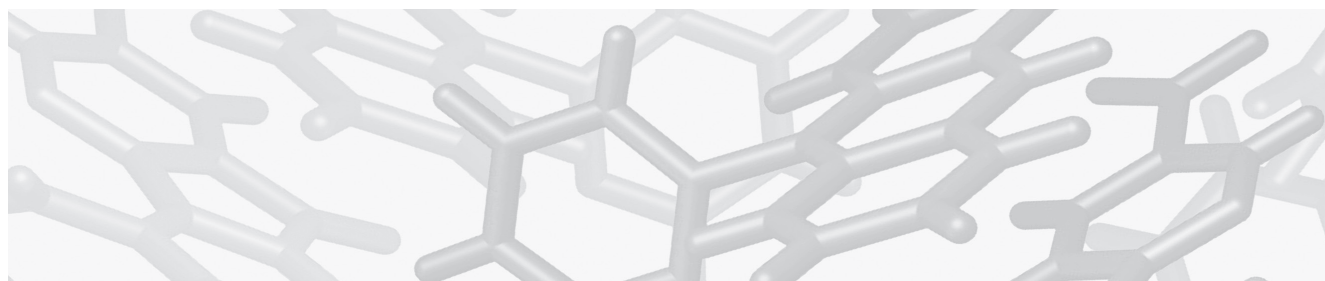
²Smorodintsev Research Institute of Influenza, 197376, Saint Petersburg, Russian Federation

The paper presents the results of an experimental study of the dose-dependent nature of functional changes in the body systems under chronic administration of uranyl acetate dihydrate in doses of 0.5 and 5.0 mg/kg per element for 18 weeks. The study was performed on 45 male outbred rats. It has been shown that uranyl acetate dihydrate in a dose of 0.5 mg/kg had no significant effect on hematological parameters. At the same time, activation of bactericidal activity of neutrophils, a decrease in the immunoregulatory index, and an increase in the blood concentration of tumor necrosis factor (TNF- α) have been revealed. The toxicant administered to rats in a dose of 5 mg/kg led to a decrease in the absolute number of erythrocytes, hemoglobin, hematocrit, platelets, the release of myelocytes into the blood, basophilia, monocytosis, the appearance of leukolysis cells and plasmation of lymphocytes. On the part of the immune system, an increase in the biocidal capacity of neutrophilic granulocytes, TNF- α production, an increase in the number of CD8+ cells, and a reduction in the CD4+/CD8+ ratio have been found. Uranyl acetate dihydrate had a dose-dependent effect only on the number of cytotoxic T-lymphocytes, T-cells with the CD4+CD8+ phenotype, on the immunoregulatory index, and on the level of TNF- α . Hyperglycemia and glucosuria were also dose-dependent. An increase in glucose in the blood and urine indicated a violation of carbohydrate metabolism and kidney function. There was a decrease in the concentration of thyroxine, testosterone and an increase in the level of insulin. Uranyl acetate dihydrate led to the development of insulin resistance. The level of hormones did not depend on the dose of the toxicant administered to the animals.

Keywords: *uranyl acetate dihydrate, hematopoiesis, hormones, immune system.*

Quote: K.I. Stosman, K.V. Sivak, T.A. Rassokha, T.N. Savateeva-Lubimova. Dose-dependent character of disturbance of hematopoietic and immune systems function, production of some hormones in experimental uranium acetate dihydrate exposure. *Toxicological Review*. 2021; 1:20–26.

Переработанный материал поступил в редакцию 23.07.2020 г.



УДК 615.099: 616-008:615.917:661.722:547.222

DOI: 10.36946/0869-7922-2021-1-27-37.

ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПОСЛЕ КОРРЕКЦИИ АЛЛОГЕННЫМИ ГЕПАТОЦИТАМИ ПРИ ОСТРОМ ТОКСИЧЕСКОМ, ИШЕМИЧЕСКОМ И АЛКОГОЛЬНОМ ПОРАЖЕНИИ ПЕЧЕНИ

Е.С. Литвинова¹,
А.И. Конопля¹,
И.М. Холименко²,
А.Г. Коцарь²

¹Курский государственный
медицинский университет (КГМУ),
305041, Курская область, г. Курск,
Российская Федерация

²Курская городская клиническая
больница скорой медицинской
помощи (КГКБ СМП), 305047,
Курская область, г. Курск, Российская
Федерация

Иммунные нарушения, возникающие при поражении печени различного генеза, и механизмы их развития остаются все еще мало изученными. Функции иммунной системы осуществляются на фоне метаболических процессов и их сдвигов, вызываемых действием на организм различных агентов, а также клеток печени - гепатоцитов. Типовые метаболические сдвиги, возникающие при поражении печени различными опасными факторами сочетаются и с определенными особенностями нарушений метаболизма в тех или иных органах и тканях, обусловленными спецификой их структурно-функциональной организации, природой индуцирующего агента и первичным звеном его воздействия на клетки и организм в целом. Взаимосвязь многочисленных метаболических сдвигов, нарушений функциональной активности гепатоцитов, возникающих при такой патологии с дисфункцией иммунной системы до настоящего времени изучена недостаточно, так же как не установлены наиболее эффективные способы коррекции. В настоящее время вопросы патогенеза, диагностики и лечения острых заболеваний печени остаются одними из актуальных в медицине как ввиду сложности диагностики и выбора оптимальных методов лечения, так и вследствие тенденции к росту количества больных этими заболеваниями. Появление и развитие клеточных технологий создали серьезные научные предпосылки в этой области.

Ключевые слова: корреляционные взаимосвязи, поражение печени, иммунные и метаболические нарушения.

Цит: Е.С. Литвинова, А.И. Конопля, И.М. Холименко, А.Г. Коцарь. Взаимосвязь метаболических и иммунологических показателей после коррекции аллогенными гепатоцитами при остром токсическом, ишемическом и алкогольном поражении печени. Токсикологический вестник. 2021; 1:27-37.

Введение. Учитывая важную роль печени в регуляции гомеостаза и постоянный рост ее заболеваемости, обусловленный химизацией производства, быта и медицины, а также алкоголизмом, выявление оптимальных условий усиления регенерации печени является особенно актуальным, а коррекция нарушений, связанных с па-

тологией печени является одной из важнейших медицинских и социальных проблем не только в нашей стране, но и во всех развитых и развивающихся. Функциональная активность этого органа существенно влияет на состояние иммунной и эндокринной функций, через которые осуществляется регуляция регенерации печени [1].

Литвинова Екатерина Сергеевна (Litvinova Ekaterina Sergeevna), кандидат медицинских наук, доцент кафедры патологической анатомии Курского государственного медицинского университета, ka_t_rona@mail.ru;

Конопля Александр Иванович (Koporya Aleksandr Ivanovich), доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, зав. кафедрой биологической химии Курского государственного медицинского университета, koporya51@mail.ru;

Холименко Иван Михайлович (Kholimenko Ivan Mikhajlovich), кандидат медицинских наук, ОБУЗ Курская городская клиническая больница скорой медицинской помощи, врач-уролог, kholimenko@yandex.ru;

Коцарь Александр Геннадьевич (Kotsar' Aleksandr Gennad'evich), доктор медицинских наук, ОБУЗ Курская городская клиническая больница скорой медицинской помощи, врач уролог, litoklast@mail.ru.

В литературе имеется большое количество работ, посвященных коррекции нарушений функций печени, в том числе с использованием клеточных технологий, есть единичные исследования по эритроцитарным нарушениям и их коррекции при патологии печени, и фактически отсутствуют работы по корригирующему влиянию на метаболическую активность эритроцитов трансплантации аллогенных клеток и их культуральных гуморальных факторов [2].

Гепатоциты стали первым типом клеток, использованных для клинических целей – клеточной терапии больных с врожденной и приобретенной патологией печени. По сравнению с клетками-предшественниками и стволовыми клеткам, культуры гепатоцитов обладают очень ограниченной способностью к делению, что является серьезным лимитирующим фактором для их практического использования, но в стрессовых условиях (в том числе и при острых поражениях печени) они впадают в состояние гиперплазии и приобретают способность к активному размножению. Данное свойство гепатоцитов легло в основу их использования для восстановительных процессов при заболеваниях печени [3].

Эффективность замещения клеточных дефектов печени при врожденных и приобретенных заболеваниях, способность стимулировать собственную регенерацию органа, отсутствие опасностей возникновения фиброзов зависят главным образом от используемых клеток. В ряде исследований показано, что при определенных условиях культивирования клетки различного типа способны экспрессировать специфичные для гепатоцитов маркеры. Однако истинная функциональность тех или иных клеток остается недоказанной, поэтому актуальными являются исследования по изучению метаболической активности аллогенных трансплантатов [4].

Взаимосвязи многочисленных метаболических и иммунологических сдвигов и нарушений функциональной активности гепатоцитов, возникающих при различной патологии печени, с функцией дестабилизации иммунной системы до настоящего времени изучена недостаточно, так же как не установлены наиболее эффективные способы фармакологической коррекции [5].

Исходя из этого, целью исследования стало установление взаимосвязей между показателями метаболического и иммунного статусов при поражении печени различными патогенными факторами после коррекции аллогенными гепатоцитами.

Материалы и методы исследования. Исследования проведены на 96 крысах-самцах Вистар массой 100-160 г. В опытах использовали животных, прошедших карантинный режим вивария Курского государственного медицинского уни-

верситета и не имевших внешних признаков каких-либо заболеваний. Все исследования проводили в одно и то же время суток, с 8 до 12 часов, с соблюдением принципов, изложенных в Конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других целей (г. Страсбург, Франция, 1986) и согласно правилам надлежащей лабораторной практики РФ (приказ МЗ РФ № 199н от 01.04.2016).

Острую интоксикацию тетрахлометаном (ЧХУ) у лабораторных животных проводили путем внутримышечного его введения в дозе 3 мл/кг в виде 50% раствора в оливковом масле пятикратно с интервалом 24 ч [6].

Острое ишемическое поражение печени (ОИПП) моделировали оперативным методом. Для этого применялся один гексеналовый внутрибрюшинный наркоз для каждой особи в дозе 30 мг/кг веса. Для операционного доступа была выбрана верхнесрединная лапаротомия. Пережатием *lig. hepatoduodenale* турникетом на протяжении 20 минут вызывали ишемическое повреждение печени. Инфильтрацию *lig. hepatoduodenale* производили 0,5 мл 0,5 % раствора новокаина, выполнялось до пережатия. Лигатуру с *lig. hepatoduodenale* снимали после истечения 20 минутной окклюзии. Операционную рану через все слои зашивали послойно, затем обрабатывали 2% раствором йода и накладывали асептическую марлевую повязку с антисептиком [7].

Алкогольную интоксикацию моделировали принудительным внутрижелудочным введением 20% раствора этанола в дозе 2 мл/кг (2,92 г/кг) через 24 часа в течение 60 дней [8].

У экспериментальных животных взятие крови на исследование производилось под наркозом, методом внутрисердечной инъекции. Методом центрифугирования в течение 5 минут при 400g. плазму и эритроциты получали из гепаринизированной крови.

Оценка иммунологической реактивности основывалась на показателях гуморального иммунного ответа (ГИО) (количество антителообразующих клеток – АОК) и гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) (разнице масс регионарного и контралатерального лимфатических узлов – РМ и по разнице количества в них кариоцитов – РК) [9].

С помощью специализированного «ТБК-Агат» («Агат-Мед» Россия) отечественного коммерческого набора, и использовании спектрофотометра «Апель-330» (Япония) при определенной длине волны 535 нм и 570 нм выполняли оценку и изучение интенсивности процессов липопероксидации. Эти процессы определяли по содержанию в эритроцитах и плазме крови двух показателей, а именно малонового диальдегида (МДА) и ацилгидроперекисей (АГП). Оценка состояния анти-

оксидантной системы организма производили методом твердофазного прямого/конкурентного иммуноферментного анализа (ИФА) с детекцией продуктов реакции в диапазоне длины волны 405-630 с применением коммерческих наборов. Методом основанном на способности ингибирования аскорбат- и ферроиндуцированного окисления твина-80 до МДА оценивали общую антиокислительную активность (ОАА) и активность супероксиддисмутазы (СОД) фирма «Bender Medsystems» (Австрия). Двумя аналитическими операциями определяли уровень стабильных метаболитов оксида азота (SM_{ON}): измерение эндогенного нитрита и превращение нитрата в нитрит с использованием нитрит-редуктазы с последующим определением общего нитрита по абсорбции азокрасителя в реакции Грисса при длине волны 540 нм с использованием коммерческого набора для твердофазного ИФА «R&D» (Англия). Учет и регистрация результатов ИФ анализа производился строго при помощи одного автоматического ридера для ИФ анализа отечественной фирмы Эфос 9305 (Россия) [10].

На градиенте плотности фикоколл-урографина ($p=1,078$) осуществляли получение нейтрофилов из взятой крови. В периферической крови оценивалась фагоцитарная нейтрофильная активность, делалось это по фагоцитарному числу, фагоцитарному показателю, индексу активности фагоцитоза (ФЧ, ФП, ИАФ). Кислород-зависимую активность нейтрофилов оценивали НСТ-спонтанным (НСТ-сп.) и НСТ-стимулированным неопсонизированным и опсонизированным зимозаном (НСТ-ст. н/з, НСТ-ст. о/з) тестом, коэффициентам опсонизации, активации на неопсонизированный и опсонизированный зимозан (КО, КАН, КАО) [11].

Для комплексной оценки эффективности препаратов и гистоморфологического подтверждения моделируемых патологических процессов проведено гистологическое исследование печени.

Выделение аллогенных гепатоцитов (АГ) от животных через 5-6 дней после рождения производилась по методике M.N. Berry, D.S. Friend, для чего после забора печени ее измельчали, гепатоциты из ткани извлекали выдавливанием с помощью стеклянного гомогенизатора в среде 199. Полученную клеточную взвесь дважды отмывали путем центрифугирования в течение 10 мин при 400 g, разбавляли в среде 199 и подсчитывали количество клеток. Их жизнеспособность определяли в тесте с трипановым синим, при этом в дальнейших опытах использовали клеточные суспензии, содержащие более 90% жизнеспособных клеток. После концентрации путем центрифугирования пул суспензии клеток от 2-3 крыс в концентрации 2×10^6 /кг сразу же вводили внутрибрюшинно, десятикратно, через 24 часа, в объеме

0,5 мл в среде 199. В течение всех манипуляций с клеточной взвесью температура использованной среды 199 составляла 36-37°C.

Статистическую обработку результатов исследования проводили по общепринятым критериям вариационно-статистического анализа с вычислением средних величин (M), ошибки средней арифметической (m) с помощью пакета компьютерных программ Microsoft Excel, 2010. Существенность различий оценивали по U-критерию. Статистически значимыми считали различия с $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Принудительное поступление этанола привело к развитию процессов ПОЛ (повышение концентрации МДА и АГП), снижению факторов антиоксидантной защиты (снижение ОАА и активности каталазы, СОД). Кроме этого, выявлено снижение уровня SM_{NO} . Введение АГ нормализовало ОАА, корригировало содержание продуктов ПОЛ и активность ферментов антиоксидантной защиты, нормализовало активность каталазы, приближало к параметрам нормы концентрацию МДГ, АГП и SM_{NO} . При оценке показателей функциональной активности эритроцитов циркулирующей крови при алкогольной интоксикации установлено повышение продуктов ПОЛ (МДА, АГП), снижение активности ферментов антиоксидантной защиты (СОД, каталаза), SM_{NO} и сорбционных свойств мембраны красных клеток крови (ССЭ, СЭГ). Применение АГ нормализовало сорбционную емкость гликокаликса, приводило к нормальным цифрам уровень МДА, SM_{NO} , каталазы, корригировало АГП и сорбционную способность эритроцитов. В отношении функционально-метаболической активности нейтрофилов периферической крови отмечено снижение их фагоцитарной способности (снижение ФП, ФЧ, ИАФ) при активации кислород-зависимого метаболизма (повышение НСТ-спонтанного и стимулированного зимозаном и ФРН). Использование АГ нормализовало ФЧ, ФРН, корригировало в сторону контроля ФП и ИАФ. Дополнительно к сказанному выше доставка АГ стабилизировала НСТ-ст. и корригировала НСТ-сп.

Острое ишемическое поражение печени также вызывало рост уровня продуктов перекисного окисления липидов, в частности это были МДА и АГП, с одновременным повышением активности каталазы. Полученные результаты свидетельствуют о выраженных изменениях иммунной реактивности и функциональной активности полиморфно-ядерных лейкоцитов и в условиях ишемического поражения печени. Применение аллогенных гепатоцитов позволило у животных в условиях ИПП нормализовать ФЧ полиморфно-ядерных лейкоцитов и их кислородзависимую активность, корригировать, но не до уровня нор-

мы, количество АОК и ФИ нейтрофилов периферической крови.

При оценке оксидантных показателей плазмы крови экспериментальных животных с ОТПП установлена активация процессов ПОЛ (повышение уровня МДА и АГП), снижение показателей антиоксидантной защиты (ОАА, активность СОД и Кат) и содержания $СМ_{NO}$. Дополнительно зафиксировано повышение всех изученных показателей функционально-метаболической активности нейтрофилов периферической крови, а именно, кислород-зависимой (повышение НСТ-сп., НСТ-ст. н/з, НСТ-ст. о/з, КАн, КАо, КО) и фагоцитарной активности (повышение ФИ, ФЧ и ИФА). Введение АГ корректирует метаболические показатели плазмы крови (исключение концентрация МДА), в эритроцитах нормализует содержание ОАА, АГП и корректирует СЕГ и активность антиоксидантных ферментов (СОД и каталаза).

Патогенез выявленных нарушений можно объяснить, основываясь на представлении взаимоотношенности разных звеньев поддерживающих постоянство внутренней среды организма. Для этого нами проведен анализ матрицы множественной корреляции между составляющими метаболического и иммунологического статусов, результаты которого представлены в табли-

цах. А также выполнен корреляционный анализ между показателями метаболического статуса на местном и системном уровне при остром тетахлометановым, ишемическом и алкогольном поражении печени после проведенной терапии аллогенными гепатоцитами.

С помощью корреляционного анализа осуществляли определение наличия достоверных связей в зависимости от группы пациентов между различными системами иммунологических и метаболических параметров: иммунный статус, метаболический статус в плазме крови и эритроцитов.

Анализируя матрицу множественной корреляции Спирмена между показателями метаболического и иммунного статусов при ишемическом поражении печени на системном уровне после коррекции аллогенными гепатоцитами нами установлено 9 достоверных сильных прямых и обратных корреляционных связей. При этом динамика МДА и СОД связана с изменениями двух показателей иммунного статуса: МДА с РМ и ФП, а СОД с КАо и ФЧ. Больше всего сильных связей выявлено между каталазой и показателями иммунного статуса АОК, НСТ-сп., НСТ-ст. о/з и КАн. (табл. 1).

Анализируя матрицу множественной корреляции Спирмена между показателями метаболического и иммунного статусов при острой ишемии

Таблица 1

Матрица множественных корреляция Спирмена между показателями метаболического и иммунного статусов при ишемическом поражении печени на системном уровне после коррекции аллогенными гепатоцитами

Показатели	МДА	АГП	ОАА	СОД	Кат	$СМ_{ON}$	Сумма
АОК	-0,44	0,10	0,02	-0,25	0,89	0,28	1
РМ	0,61	-0,3	-0,17	0,3	0,06	-0,18	1
РК	-0,07	0,28	-0,21	-0,3	-0,17	-0,5	-
ФП	-0,53	0,29	-0,18	-0,39	0,25	0,18	1
ФЧ	0,44	-0,19	-0,02	0,78	0,12	0,39	1
ИАФ	0,10	-0,64	-0,48	0,13	-0,26	-0,16	1
НСТ-сп.	-0,28	0,37	0,16	-0,02	0,6	0,19	1
НСТ-ст. н/з	0,41	-0,2	-0,22	0,29	-0,01	-0,22	-
НСТ-ст. о/з	0,15	0,22	-0,08	0,26	0,6	-0,16	1
КАн	0,11	-0,34	-0,13	0,26	0,6	0,08	1
КАо	0,09	0,06	0,52	0,70	0,3	0,37	1
КО	0,27	0,16	0,07	0,38	-0,19	0,26	-
Сумма	2	1	-	2	4	-	9

печени после коррекции аллогенными гепатоцитами на местном уровне установлено 12 достоверных сильных корреляционных связей. При этом наибольшее количество взаимосвязей выявлено между АОК и следующими показателями метаболического статуса: МДА, ОАА, СОД, каталаза и СЕЭ. Сам же показатель СЕЭ коррелировал с тремя показателями иммунного статуса: АОК, НСТ-сп, КО. Остальные показатели имели по одной – две сильных взаимосвязи (табл. 2).

Сравнивая показатели, полученные при составлении матрицы Спирмена, между значениями метаболического статуса на системном и местном уровне после коррекции аллогенными гепатоцитами, также выявлен ряд взаимосвязей. Установлено 6 корреляционных связей, 2 связи для местного уровня каталазы (ОАА, СЕЭ), 2 связи для местного уровня $СМ_{ON}$ (СОД, каталаза). По одной взаимосвязи на местном уровне у МДА с ОАА и ОАА с СЕГ (табл. 3).

Далее также нами был проведен аналогичный корреляционный анализ, но при токсическом поражении печени после коррекции аллогенными гепатоцитами. Анализируя матрицу множественной корреляции Спирмена между показателями

метаболического и иммунного статусов при токсическом поражении печени на системном уровне нами установлено 7 достоверных сильных прямых и обратных корреляционных связей. При этом по 2 связи для показателя каталазы (АОК, НСТ-ст. н/з), ОАА (КАн, КО), РК (МДА, СОД), КАн (ОАА, $СМ_{ON}$). Наиболее сильная прямая связь отмечена между КАн и $СМ_{ON}$ (табл. 4).

Анализируя матрицу множественной корреляции Спирмена между изучаемыми показателями на местном уровне после коррекции аллогенными гепатоцитами установлены 12 достоверных связей, при этом динамика метаболических показателей МДА и АГП связана с 3 различными показателями иммунного статуса, а уровень СЕГ с двумя показателями (АОК, ИАФ). Показатель иммунного статуса АОК также был связан прямой и обратной связью с показателями метаболического статуса (МДА, СОД СЕГ) (табл. 5).

Сравнивая показатели, полученные при составлении матрицы Спирмена, между значениями метаболического статуса на системном и местном уровне после коррекции аллогенными гепатоцитами, также выявлено 6 достоверных корреляций. Каталаза на системном уровне была вза-

Таблица 2

Матрица множественных корреляция Спирмена между показателями метаболического и иммунного статусов при острой ишемии печени на местном уровне после коррекции аллогенными гепатоцитами

Показатели	МДА	АГП	ОАА	СОД	Каталаза	СЕЭ	СЕГ	Сумма
АОК	-0,6	0,36	0,9	0,6	0,6	0,81	-0,05	5
РМ	0,7	0,03	-0,32	-0,22	-0,15	-0,16	-0,12	1
РК	-0,26	-0,04	-0,06	-0,53	-0,6	0,09	0,5	1
ФП	-0,44	0,07	0,42	-0,05	-0,08	0,18	0,23	-
ФЧ	0,23	-0,23	-0,01	0,25	0,25	-0,02	-0,02	-
ИАФ	-0,11	0,07	0,001	0,07	0,05	-0,03	0,20	-
НСТ-сп.	-0,18	-0,41	0,72	0,25	0,23	0,86	0,06	2
НСТ-ст. н/з	0,11	-0,6	0,11	-0,17	-0,17	0,39	0,4	1
НСТ-ст. о/з	-0,1	0,31	0,12	0,14	0,13	0,26	0,01	-
КАн	-0,1	0,2	0,45	0,23	0,25	0,40	-0,03	-
КАо	0,35	-0,24	0,08	0,5	0,49	0,14	-0,63	1
КО	0,45	-0,21	-0,45	-0,34	-0,34	-0,6	-0,05	1
Сумма	2	1	2	1	2	3	1	12

Таблица 3

Матрица множественных корреляция Спирмена между показателями метаболического статуса на местном и системном уровне при острой ишемии печени после коррекции аллогенными гепатоцитами

Показатели	Местный уровень						
	МДА	АГП	ОАА	СОД	Кат	СМ _{ОН}	Сумма
Системный уровень							
МДА	0,28	-0,14	-0,07	0,33	-0,21	0,04	-
АГП	-0,22	-0,13	-0,35	-0,43	0,32	-0,30	-
ОАА	-0,6	0,12	0,13	-0,18	0,81	0,39	2
СОД	-0,38	-0,15	0,44	0,17	0,48	0,6	1
Каталаза	-0,35	-0,2	0,44	0,15	0,48	0,6	1
СЕЭ	-0,39	0,22	0,22	-0,01	0,78	0,15	1
СЕГ	0,42	-0,01	-0,6	-0,08	-0,20	-0,27	1
Сумма	1	-	1	-	2	2	6

Таблица 4

Матрица множественных корреляция Спирмена между показателями метаболического и иммунного статусов при токсическом поражении печени на системном уровне после коррекции аллогенными гепатоцитами

Показатели	МДА	АГП	ОАА	СОД	Кат	СМ _{ОН}	Сумма
АОК	0,02	0,2	0,13	-0,04	-0,6	0,1	1
РМ	0,18	0,18	-0,18	-0,3	0,06	0,07	-
РК	0,6	0,37	0,03	-0,6	-0,07	-0,02	2
ФП	0,06	0,07	0,01	0,02	-0,43	0,10	-
ФЧ	-0,17	0,32	0,17	-0,3	0,02	0,17	-
ИАФ	0,33	-0,38	0,02	-0,1	-0,03	0,1	-
НСТ-сп.	0,28	0,36	-0,25	-0,27	-0,32	-0,05	-
НСТ-ст. н/з	0,01	-0,1	0,07	-0,47	-0,6	0,2	1
НСТ-ст. о/з	0,30	-0,27	-0,1	-0,04	-0,41	0,03	-
КАн	0,01	-0,31	0,70	-0,1	0,12	-0,82	2
КАо	-0,03	0,05	-0,12	0,02	-0,44	0,3	-
КО	-0,32	-0,4	-0,6	-0,06	-0,03	-0,01	1
Сумма	1	-	2	1	2	1	7

Таблица 5

Матрица множественных корреляция Спирмена между показателями метаболического и иммунного статусов при токсическом поражении печени на местном уровне после коррекции аллогенными гепатоцитами

Показатели	Кол-во	Нб	МДА	АГП	ОАА	СОД	Кат	СЕЭ	СЕГ	Сумма
АОК	-0,02	0,33	-0,79	-0,16	0,03	0,6	0,06	-0,45	0,6	3
РМ	-0,18	-0,34	0,35	-0,02	-0,07	0,39	-0,24	0,3	-0,19	-
РК	0,32	0,2	0,10	0,6	-0,2	0,25	-0,81	0,3	0,25	2
ФП	0,22	0,01	-0,1	0,6	-0,25	-0,08	-0,28	-0,15	-0,09	1
ФЧ	-0,25	0,06	0,43	0,87	-0,08	-0,13	-0,27	0,12	-0,27	1
ИАФ	0,44	0,18	-0,62	-0,21	0,17	0,01	-0,3	-0,25	0,61	2
НСТ-сп.	-0,47	0,01	-0,005	-0,47	0,2	0,35	0,3	0,32	-0,2	-
НСТ-ст. н/з	-0,07	0,34	-0,6	0,15	0,03	0,27	-0,14	0,06	0,45	1
НСТ-ст. о/з	0,22	-0,31	-0,47	0,05	-0,03	-0,11	-0,14	-0,09	0,14	-
КАн	0,23	0,25	-0,13	-0,22	0,44	-0,07	0,01	0,37	-0,13	-
КАо	-0,6	-0,25	-0,09	-0,22	-0,12	0,03	0,45	0,09	-0,38	1
КО	0,12	-0,6	0,27	-0,34	0,24	0,10	0,19	0,13	0,06	1
Сумма	1	1	3	3	-	1	1	-	2	12

имосвязана с 2 показателями на местном уровне: положительной сильной связью с концентрацией СОД и отрицательной сильной связью с МДА. Напротив же показатель местного метаболического статуса СОД, достоверно был связи с тремя показателями системного метаболического статуса (Каталаза, СОД, СЕЭ). Другие выявленные взаимосвязи были между единичными показателями (табл. 6).

Последним нами был проведен аналогичный корреляционный анализ, однако, изучались взаимосвязи, полученные при интоксикации этанолом после коррекции аллогенными гепатоцитами. При оценке матрицы множественной корреляции Спирмена между показателями метаболического статуса на местном и системном уровне при интоксикации этанолом выявлено определено 6 достоверных корреляций. Так, динамика уровня АГП и $СМ_{ON}$ на местном уровне связана с изменениями 3 и 2, соответственно, показателей метаболического статуса на системном уровне, а концентрации показателей системного уровня АГП и ОАА коррелируют с 2 показателями местного уровня (табл. 7).

При оценке матрицы множественной корреляции Спирмена между показателями метаболического и иммунного статусов при алко-

гольной интоксикации печени на системном уровне после коррекции аллогенными гепатоцитами выявлено 13 достоверных корреляций. Так, динамика уровня МДА была связана с тремя показателями ФЧ, НСТ-сп, НСТ-сп н/з. Динамика ОАА и $СМ_{ON}$ коррелирует с двумя показателями НСТ-сп, НСТ-сп н/з. СОД достоверно взаимодействовала с тремя показателями иммунного статуса – АОК, ФЧ, НСТ-сп н/з. Каталаза коррелировала с АОК и НСТ-сп о/з. (табл. 8).

Описывая множественные корреляции выявленные между показателями метаболического и иммунного статусов при алкогольной интоксикации печени на местном уровне после коррекции аллогенными гепатоцитами нами установлены 15 достоверных прямых и обратных взаимосвязей. АГП достоверно коррелировали с 6 показателями (АОК, РК, ФП, НСТ-сп, НСТ-сп н/з). СОД коррелировала с двумя показателями (РМ и ФП). $СМ_{ON}$ были в тесной корреляции с ИАФ и Кан. ССЭ взаимодействовала с РК НСТ-сп. Показатель СЕГ коррелировал с тремя показателями РМ, НСТ-сп н/з, КО (табл. 9).

Специализированные клетки печени (гепатоциты) стали одним из первых типом клеток, использованных для клинических целей – кле-

Таблица 6

Матрица множественных корреляция Спирмена между показателями метаболического статуса на местном и системном уровне при токсическом поражении печени после коррекции аллогенными гепатоцитами

Показатели	Местный уровень						
	МДА	АГП	ОАА	СОД	Кат	СМОН	Сумма
Системный уровень							
Нв	0,21	0,34	0,64	-0,17	0,053	-0,2	1
МДА	-0,33	0,06	-0,28	0,1	0,33	0,23	-
АГП	0,1	0,38	0,03	-0,28	0,1	0,34	-
ОАА	0,06	-0,3	0,35	-0,2	-0,1	-0,73	1
СОД	0,22	0,43	0,05	-0,6	-0,36	-0,02	1
Каталаза	-0,68	-0,34	-0,15	0,6	-0,17	-0,03	2
СЕЭ	0,12	-0,05	0,04	-0,64	-0,33	-0,21	1
СЕГ	0,23	0,11	-0,07	-0,13	0,02	0,16	-
Сумма	1	-	1	3	-	1	6

Таблица 7

Матрица множественных корреляций Спирмена между показателями метаболического статуса на местном и системном уровне при интоксикации этанолом после коррекции аллогенными гепатоцитами

Показатели	Местный уровень							
	МДА	АГП	СОД	Каталаза	СМОН	ССЭ	СЕГ	Сумма
Системный уровень								
МДА	0,13	0,6	0,07	-0,18	-0,21	-0,2	-0,4	1
АГП	-0,23	-0,4	-0,6	0,12	-0,6	-0,02	-0,1	2
ОАА	0,04	0,62	-0,16	0,01	-0,6	-0,4	-0,4	2
СОД	0,11	0,7	-0,06	-0,22	-0,07	-0,41	-0,36	1
Кат	-0,02	0,43	-0,24	-0,32	0,13	-0,31	-0,23	-
СМОН	-0,21	-0,05	-0,28	-0,34	0,22	0,1	0,06	-
Сумма	-	3	1	-	2	-	-	6

точной терапии больных с врожденными и приобретенными дефектами печени. Интерес к ним с научной и практической стороны в настоящее время усилился в еще большей степени в связи с тем, что единственным способом лечения недостаточности печени, как исхода вирусных, аутоиммунных гепатитов, наследственных заболеваний и интоксикаций, является недостаток донорских органов. По сравнению с клетками-предшественниками и стволовыми клетками, культуры первичных гепатоцитов

обладают очень ограниченной способностью к делению, что является серьезным лимитирующим фактором для их практического использования. Эффективность трансплантации гепатоцитов существенно ограничивается в результате развития нарушений иммунного гомеостаза [11].

Также механизм действия гепатоцитов, применяемых для коррекции поврежденной ткани печени нельзя считать окончательно выясненным. Ряд авторов полагают, что лечебный эффект

Таблица 8

Матрица множественных корреляция Спирмена между показателями метаболического и иммунного статусов при этаноловой интоксикации печени на системном уровне после коррекции аллогенными гепатоцитами

Показатели	АОК	РМ	РК	ФП	ФЧ	ИАФ	НСТ-сп	НСТ-сп н/з	НСТ-сп о/з	Кан	КАо	КО	Сумма
МДА	0,25	0,3	-0,2	-0,43	0,62	0,15	0,71	0,73	-0,3	0,03	-0,5	0,5	3
АГП	-0,3	-0,2	-0,1	-0,01	0,13	-0,23	-0,26	-0,4	-0,2	-0,4	-0,1	0,1	-
ОАА	0,16	0,1	0,4	-0,4	0,45	-0,04	0,63	0,85	-0,3	-0,4	-0,1	0,1	2
СОД	0,66	0,2	0,32	-0,45	0,64	0,02	0,41	0,79	-0,5	-0,2	-0,6	0,2	4
Кат	0,72	0,1	0,18	-0,12	0,34	0,12	-0,1	0,23	-0,6	-0,2	-0,4	0,4	2
СМОН	0,4	-0,1	-0,1	0,2	-0,2	-0,18	-0,66	0,65	-0,1	-0,3	-0,4	0,2	2
Сумма	2	-	-	-	2	-	3	4	1	-	1	-	13

Таблица 9

Матрица множественных корреляция Спирмена между показателями метаболического и иммунного статусов при этаноловой интоксикации печени на местном уровне после коррекции аллогенными гепатоцитами

Показатели	АОК	РМ	РК	ФП	ФЧ	ИАФ	НСТ-сп	НСТ-сп н/з	НСТ-сп о/з	Кан	КАо	КО	Сумма
МДА	0,34	0,14	-0,3	0,2	0,3	0,32	-0,25	0,27	-0,03	0,2	-0,2	0,14	-
АГП	0,62	-0,2	0,63	-0,7	0,3	-0,16	0,68	0,62	-0,65	-0,1	-0,1	0,11	6
СОД	0,05	0,68	-0,4	0,7	-0,2	0,31	-0,16	0,1	0,43	0,3	-0,1	-0,3	2
Ката лаза	-0,25	-0,4	-0,2	-0,2	-0,1	0,05	-0,02	0,13	-0,08	0,1	0,14	0,41	-
СМОН	0,37	0,04	0,1	0,4	-0,2	0,6	-0,4	-0,4	-0,03	0,6	-0,1	0,04	2
ССЭ	0,08	-0,4	-0,6	0,1	-0,1	0,04	-0,6	-0,22	0,17	0,1	0,02	0,42	2
СЕГ	0,07	-0,6	-0,1	0,1	0,1	0,4	-0,4	-0,6	0,01	0,4	0,01	0,6	3
Сумма	1	2	2	2		1	2	2	1	1	-	1	15

связан с органозамещающей функцией. В настоящее время доказано, что трансплантированные изолированные стволовые клетки, гепатоциты не столько увеличивают функциональную массу печени, сколько изменяют гуморальные и молекулярные механизмы, отвечающие за активацию функции оставшихся гепатоцитов реципиента и регенерацию, путем выработки низкомолекулярных гуморальных факторов [12,13].

Полученные нами данные позволяют заключить, что выявленная активация свободно-радикального окисления, является фактором патогенеза многих заболеваний. Данные по-

лученные в работе свидетельствуют о выраженных изменениях иммунной реактивности и функциональной активности полиморфноядерных лейкоцитов в условиях ишемического, токсического и алкогольного поражения печени, а также возможности использования аллогенных гепатоцитов в коррекции выявленных иммунометаболических нарушений. Следует отметить, что применение аллогенных гепатоцитов в большей степени оказывает нормализующее и корригирующее влияние на показатели иммунной реактивности и функциональной активности полиморфноядерных лейкоцитов.

Эффекты и механизмы действия трансплантируемых аллогенных гепатоцитов, выявляемые при их введении связаны не столько с их организмомещающей функцией, сколько с нормализацией и активацией аутологичных клеток печени через гуморальные соединения (пептидов, факторов роста, цитокинов и др.), изменяющих количественно и качественно состав сыворотки циркулирующей крови и через это содержание и соотношение белков и липидов мембраны эритроцитов [13,14].

Наряду с этим требуют своего дальнейшего исследования механизмы метаболической коррекции имплантированных гепатоцитов. Перспективным является выделение из культуральной жидкости гепатоцитов «действующего» начала. Одним из оснований для этого являются полученные ранее в нашей лаборатории факты о том, что не только трансплантация аллогенных интактных гепатоцитов, но и введение полученной на их основе культуральной жидкости, реципиентам с экспериментальной гипоксией печени, острым токсическим гепатитом, вызванным четыреххлористым углеродом, значительно снижают развитие в печени иммуновоспалительного синдрома, нормализуют синтетическую функцию гепатоцитов, пре-

дотвращают развитие окислительного стресса и нарушения врожденного иммунитета [15].

Для более широкого внедрения заместительной клеточной терапии в клиническую практику необходимы дальнейшие экспериментальные исследования, направленные на определение иммунометаболических эффектов различных вариантов регенеративной клеточной терапии (использование ксено- и аллогенных трансплантатов и их культуральной жидкости), а также их сочетанное применение с фармакологическими препаратами при патологии печени [6].

Выводы.

1. Корреляционный анализ между показателями иммунного статуса и окислительного стресса, доказывает наличие взаимосвязи и взаимозависимости в генезе патологических изменений происходящих в печени, что может служить оценкой степени тяжести и эффективности проводимого лечения.

2. Применение аллогенных гепатоцитов оказывает выраженное положительное влияние на показатели иммунометаболического статуса при остром ишемическом, токсическом и алкогольном поражении печени, что в свою очередь может быть использовано при терапии данных нарушений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Медведева С.Ю., Мухлынина Е.А., Булавинцева Т.С., Данилова И.Г. Участие фактора стволовой клетки в репаративной регенерации печени при ее токсическом повреждении. Медицинская иммунология. 2015; 17 спец. выпуск: 32.
2. Жексенова А.Н., Насыров И.Н., Калдыбаева А.Т., Батырова Т.Ж., Альмаханова М.Ж. Морфологическое изменение в лимфоузлах при воспалительном процессе у крыс на фоне воздействия фетальными гепатоцитами. Аллергология и иммунология. 2015; 16 (3): 311.
3. Лызиков А.Н., Скуратов А.Г., Осипов Б.Б. Механизмы регенерации печени в норме и при патологии. Проблемы здоровья и экологии. 2015; 1 (43): 4-9
4. Ляндуп А.В., Онищенко Н.А., Шагидулин М.Ю., Крашениников М.Е. Стволовые прогениторные клетки печени и костного мозга как регуляторы восстановительной регенерации поврежденной

печени. Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2010; 12 (2):100-107.
5. Liu K.X., Kato Y., Matsumoto K., Nakamura T., Kaku-T., Sugiyama Y. Characterization of the enhancing effect of protamine on the proliferative activity of hepatocyte growth factor in rat hepatocytes. Pharm Res. 2009; 26 (4): 1012-1021.
6. Конопля А.И., Литвинова Е.С., Быстрова Н.А., Разумова М.С., Чуева Т.В. Иммунометаболические нарушения при экспериментальном остром токсическом поражении печени: коррекция ксеногенными и аллогенными гепатоцитами. Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2016; 18 (2): 91-98.
7. Литвинова Е.С., Конопля А.И., Дудка В.Т. Эффективность белков аллогенных гепатоцитов в коррекции иммунометаболических нарушений при остром ишемическом поражении печени. Курский научно-практический вестник «Человек

и его здоровье». 2019; 1: 103-113. DOI: 10.21626/vestnik/2019-1/12.
8. Конопля А.И., Локионов А.Л., Дудка В.В., Долгарева С.А., Сорокин А.В., Бушмина О.Н. Хроническая интоксикация этанолом: метаболические изменения, коррекция нарушений. Токсикологический вестник. 2015; 134 (5): 25-30.
9. Мальберг К., Зигль Э. Иммунологические методы. М.: Медицина; 1987.
10. Холименко И.М., Конопля А.И., Братчиков О.И., Быстрова Н.А., Маврин М.Ю., Шатохин М.Н. Оксидантный стресс при остром серозном и гнойном пиелонефрите. Нефрология. 2017; 21 (1): 87-94. DOI: <http://dx.doi.org/10.24884/1561-6274-2017-1-87-94>.
11. Зиннин В.Ю., Годков В.Г. Способ количественной оценки кислородзависимого метаболизма нейтрофильных гранулоцитов человека. Клиническая и лабораторная диагностика. 2004; 8: 26-29.

12. Евсеева М.Н., Шептулина А.Ф., Рубцов Ю.П. Перспективы создания аутологичных гепатоцитов для лечения печеночной недостаточности. РЖГТК. 2015; 6: 49-57.
13. Лепехова С.А., Апарцин К.А., Искра А.И. Роль фактора роста гепатоцитов в регенерации печени. Фундаментальные исследования. 2014; 2: 187-92.
14. Медведева С.Ю., Мухлынина Е.А., Булавинцева Т.С., Данилова И.Г. Участие фактора стволовой клетки в репаративной регенерации печени при ее токсическом повреждении. Медицинская иммунология. 2015; 17: 32.
15. Шагидулин М.Ю., Онищенко Н.А., Крашениников М.Е. Трансплантация гепатоцитов как метод лечения печеночной недостаточности: экспериментальный и клинический опыт. Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2010; XII (4) 53-60.

REFERENCES:

1. Medvedeva S.Yu., Mukhlynina E.A., Bulavintseva T.S., Danilova I.G. Stem cell factor participation in the reparative regeneration of the liver during its toxic damage. Medical Immunology. 2015; 17: 32 (in Russian).
2. Zheksenova A.N., Nasyrov I.N., Kaldybaeva A.T., Batoryova T.Zh., Almakanova M.Zh. Morphological changes in the lymph nodes in rats under the inflammatory process against the background of exposure to fetal hepatocytes. Allergology and Immunology. 2015; 16(3): 311 (in Russian).

3. Lyzikov A.N., Skuratov A.G., Osipov B.B. Mechanisms of liver regeneration in normal and pathological conditions. Problems of Health and Ecology. 2015; 1 (43): 4-9 (in Russian).
4. Ljundup A.V., Onishchenko N.A., Shagidulin M.Yu., Krashennikov M.E. Liver and bone marrow stem progenitor cells as regulators of regenerative regeneration of damaged liver. Bulletin of Transplantology and Artificial Organs. 2010; 12(2):100-107 (in Russian).
5. Liu K.X., Kato Y., Matsumoto K., Nakamura T., Kaku-T., Sugiyama Y.

Characterization of the enhancing effect of protamine on the proliferative activity of hepatocyte growth factor in rat hepatocytes. Pharm Res. 2009; 26(4):1012-1021.
6. Konoplya A.I., Litvinova E.S., Bystrova N.A., Razumova M.C., Chueva T.V. Immunometabolic disorders in experimental acute toxic liver damage: correction by xenogenic and allogeneic hepatocytes. Bulletin of Transplantology and Artificial Organs. 2016; 18(2) - 91-98. DOI: 10.15825/1995-1191-2016-2-91-98 (in Russian).

7. Litvinova E.S., Konoplya A.I., Dudka V.T. Effectiveness of allogeneic hepatocyte proteins in the correction of immunometabolic disorders in acute ischemic liver damage. Kursk Scientific and Practical Bulletin «Man and Health». 2019; 1: 103-113. DOI: 10.21626/vestnik/2019-1/12 (in Russian).
8. Konoplya A.I., Loktionov A.L., Dudka V.V., Dolgareva S.A., Sorokin A.V., Bushmina O.N. Chronic ethanol intoxication: metabolic changes, correction of disorders. Toxicological Review. 2015;134 (5): 25-30 (in Russian).

9. Mal'berg K., Siegl E. Immunological methods. M.: Meditsina; 1987 (in Russian).
10. Kholimenko I.M., Konoplya A.I., Bratchikov O.I., Bystrova N.A., Mavrin M.Yu., Shatokhin M.N. Oxidative stress in acute serous and purulent pyelonephritis. *Nephrology*. 2017; 21 (1): 87-94 (in Russian).
11. Zinkin V.Yu., Godkov V.G. Method for quantifying the oxygen-dependent metabolism of human neutrophilic granulocytes. *Clinical and Laboratory Diagnostics*. 2004; 8: 26-29 (in Russian).
12. Evseeva M.N., Sheptulina A.F., Rubtsov Yu.P. Prospects for the creation of autologous hepatocytes for the treatment of liver failure. *Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, and Coloproctology*. 2015; 6: 49-57 (in Russian).
13. Lepekhova S.A., Aparcin K.A., Iskra A.I. The role of hepatocyte growth factor in liver regeneration. *Basic Research*. 2014; 2: 187-92 (in Russian).
14. Medvedeva S.Yu., Mukhlynina E.A., Bulavintseva T.S., Danilova I.G. Stem cell factor participation in the reparative regeneration of the liver during its toxic damage. *Medical Immunology*. 2015; 17: 32 (in Russian).
15. Shagidullin M.Yu., Onishchenko N.A., Krashennikov M.E. Hepatocyte transplantation as a method of liver failure treatment: experimental and clinical experience. *Bulletin of Transplantology and Artificial Organs*. 2010; XII (4): 53-60 (in Russian).

E.S. Litvinova¹, A.I. Konoplya¹, I.M. Kholimenko², A.G. Kotsar²

RELATIONSHIP BETWEEN METABOLIC AND IMMUNOLOGICAL INDICATORS AFTER CORRECTION BY ALLOGENIC HEPATOCYTES IN ACUTE TOXIC, ISCHEMIC AND ALCOHOL LIVER INJURY

¹Kursk State Medical University, 305041, Kursk Region, Kursk, Russian Federation

²Kursk City Clinical Hospital for Emergency Medicine, 305047, Kursk Region, Kursk, Russian Federation

Immune disorders arising from liver damage of various origins and the mechanisms of their development are still poorly understood. The functions of the immune system are carried out against the background of metabolic processes and their shifts caused by the action of various agents on the body, as well as liver cells - hepatocytes. Typical metabolic changes that occur when the liver is affected by various toxic factors are combined with certain features of metabolic disorders in certain organs and tissues, due to the specifics of their structural and functional organization, the nature of the inducing agent and the primary link of its effect on cells and the body as a whole. The relationship of numerous metabolic changes, violations of the functional activity of hepatocytes arising in such a pathology with the dysfunction of the immune system has not yet been sufficiently studied, as well as the most effective methods of correction have not been established. Currently, the issues of pathogenesis, diagnosis and treatment of acute liver diseases remain among the most relevant in medicine, both due to the complexity of diagnosis and the choice of optimal treatment methods, and the tendency towards an increase in the number of patients with these diseases. The emergence and development of cellular technologies have created serious scientific prerequisites in this area.

Keywords: *correlation relationships, liver damage, immune and metabolic disorders.*

Quote: E.S. Litvinova, A.I. Konoplya, I.M. Kholimenko, A.G. Kotsar. Relationship between metabolic and immunological indicators after correction by allogenic hepatocytes in acute toxic, ischemic and alcohol liver injury. *Toxicological Review*. 2021; 1:27-37.

Материал поступил в редакцию 21.04.2020 г.



СПОСОБ НЕИНВАЗИВНОЙ ДИАГНОСТИКИ ПОРАЖЕНИЯ СОЕДИНЕНИЯМИ НЕРВНО-ПАРАЛИТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОСЕНСОРА В КЛИНИЧЕСКИХ И ПОЛЕВЫХ УСЛОВИЯХ

Э.Т. Гайнуллина¹,
С.Б. Рыжиков²,
В.Н. Фатеенков¹, М.А. Понсов¹,
Л.В. Петракова¹

¹ФГБУ «27 Научный центр»
министерства обороны Российской
Федерации», 105005, г. Москва,
Российская Федерация
²ФГБОУВО Московский
государственный университет
им. М.В. Ломоносова, физический
факультет, 119991, г. Москва,
Российская Федерация

Рассмотрены вопросы обоснования необходимости создания и перспективности разработки методики неинвазивной диагностики поражения соединениями нервно-паралитического действия в полевых условиях, отвечающей современным требованиям по чувствительности, специфичности и быстродействию. В результате проведенных исследований предложен способ ранней и достоверной неинвазивной диагностики поражения соединениями нервно-паралитического действия с применением биосенсора необратимых ингибиторов холинэстераз.

Ключевые слова: неинвазивная диагностика, соединения нервно-паралитического действия, биосенсор.

Цит: Э.Т. Гайнуллина, С.Б. Рыжиков, В.Н. Фатеенков, М.А. Понсов, Л.В. Петракова. Способ неинвазивной диагностики поражения соединениями нервно-паралитического действия с использованием биосенсора в клинических и полевых условиях. Токсикологический вестник. 2021; 1:38-42.

Введение. В настоящее время существует реальная опасность отравления нейротоксинами. Несмотря на существование Международной Конвенции о запрещении разработки, производства, накопления и применения химического оружия и о его уничтожении, наиболее опасные отравляющие вещества, содержащие нейротоксины, применялись террористами в Токийском метро и в Сирии. Подробные данные о применении химического оружия в мирное время приведены в публикации [1]. Таким образом, совершенствование диагностики отравления нейротоксинами является важным и актуальным.

Целью данного исследования является разработка способа ранней и достоверной диагностики поражения соединениями нервно-паралитического действия в клинических и полевых условиях, отвечающего современным требованиям по чувствительности, специфичности и времени формирования аналитического сигнала.

В наших исследованиях мы ориентировались на неинвазивную диагностику, поскольку она имеет определенные преимущества перед рядом традиционных методов: рентген, биопсия, забор крови и др.

Неинвазивная диагностика имеет следующие преимущества:

- исключает внесение во внутреннюю среду организма болезнетворных вирусов, бактерий и ксенобиотиков, как это может случиться при заборе крови;
- позволяет исключить лучевую нагрузку на организм в отличие от диагностики с применением рентгенологических и радиоизотопных методов исследования;
- освобождает пациента от комплекса болевых и неприятных ощущений;
- неинвазивные методы с использованием сенсорных и передающих сигналы устройств, позволяют решать медико-социальные задачи. На-

Гайнуллина Эра Тазетдиновна (Gainullina Era Tazetdinovna), доктор химических наук, старший научный сотрудник ФГБУ «27 Научный центр» Министерства обороны Российской Федерации»

Фатеенков Владимир Николаевич (Fateenkov Vladimir Nikolaevich), кандидат военных наук, доцент, начальник научно-исследовательского отдела ФГБУ «27 Научный центр» Министерства обороны Российской Федерации»

Рыжиков Сергей Борисович (Ryzhikov Sergey Borisovich), доктор педагогических наук, доцент ФГБОУВО МГУ им. М.В. Ломоносова, sbr@physics.msu.ru

Понсов Михаил Александрович (Ponsov Mikhail Aleksandrovich), кандидат химических наук, доцент, старший научный сотрудник ФГБУ «27 Научный центр» Министерства обороны Российской Федерации»

Петракова Лидия Васильевна (Petraikova Lidiya Vasilievna), научный сотрудник ФГБУ «27 Научный центр» Министерства обороны Российской Федерации»

пример, создание дистанционных аларм-систем может быть полезным для наблюдения из больницы или поликлиники за больными с опасностью внезапной смерти (гипертонической болезнью или др.) и оказания своевременной помощи при наступивших критических состояниях.

На сегодняшний день существуют различные способы использования неинвазивной диагностики. Примером неинвазивной диагностики является исследование химического состава выдыхаемого воздуха. Определение наличия в выдыхаемом воздухе следов этанола проводится очень давно и широко используется работниками ГИБДД для выявления случаев употребления спиртных напитков водителями транспортных средств. В настоящее время в выдыхаемом воздухе определяют более 100 химических соединений. Состав выдыхаемого воздуха и крови взаимосвязаны, что позволяет в определенных случаях отказываться от исследования крови и проводить определение содержания искомым веществ в выдыхаемом воздухе.

В 2018 г. был создан новый метод неинвазивной диагностики малярии, за который 25-летний Брайан Гитта из Уганды получил престижную премию «Africa for Engineering Innovation» от Королевской инженерной академии Великобритании [2]. Для диагностики малярии новым методом не нужен забор крови, достаточно провести красным лучом света по пальцу и обнаружить изменения в форме, цвете и концентрации эритроцитов, пораженных малярией. В течение минуты результаты отправляются на компьютер или мобильный телефон, подключенный к устройству. Разработанный тест не требует участия специалиста в его проведении. Значимость этого способа диагностики определяется тем, что малярия является главной причиной высокой смертности в Африке.

Неинвазивная диагностика поражения нейротоксинами предложена на основе светового зрачкового рефлекса (СЗР) [3]. СЗР определяет сужение и последующее расширение зрачка в ответ на свет в результате антагонистических действий сфинктера и расширителя мышцы радужки. Так как эти мышцы иннервируются парасимпатическим и симпатическим нервами, то различные параметры СЗР могут быть использованы в качестве индикаторов. Таким образом, СЗР обеспечивает важный показатель вегетативной нервной функции системы. В настоящее время СЗР является признанным инструментом для количественной неинвазивной диагностики поражения токсичным химическим веществом [3].

Существуют неинвазивные диагностики заболеваний с использованием пробы слюны, которые основаны на содержании в ней множества

биомаркеров, что делает возможным диагностирование значительного числа заболеваний [4]. Маркеры слюны могут точно отражать нормальное и болезненное состояния человека. Слюна является клинически информативной биологической жидкостью, которая позволяет успешно проводить диагностику в клинических условиях.

Развитие неинвазивных методов в диагностике в определенной степени связано с появлением нового направления – использования биосенсора (БС) – устройства, состоящего из активного компонента и преобразователя аналитического сигнала в регистрируемый сигнал (световой, звуковой и т.п.). Биосенсоры открывают новые пути неинвазивного определения ряда веществ в поте, слюне, слезе и моче, которые с одной стороны, являются доступными образцами, с другой стороны – накапливают высокую дозу отравляющих веществ в организме человека.

На основе успехов, достигнутых в области энзимологии, биотехнологии и сенсорных технологий, опубликовано значительное количество статей и патентов, посвященных разработке оптического биосенсора (ОБС) на основе холинэстеразы для определения нейротоксинов, в том числе фосфорорганических отравляющих веществ (ФОВ). Обзор биосенсоров такого назначения представлен в статье [5].

Повышенный интерес к разработке ОБС для определения ФОВ подчеркивает актуальность этих исследований, что, по-видимому, явилось основанием для проведения IV совещания Научного консультативного совета временной рабочей группы по проблемам химии и биологии с повесткой дня «Биосенсоры», проходившего в Гааге с 5 по 7 ноября 2013 г. В итогах совещания в Гааге было отмечено, что наиболее интенсивные исследования ведутся по двум направлениям [6]:

1) разработка БС на основе ферментов ацетилхолинэстеразы (АХЭ) или бутирилхолинэстеразы (БХЭ) для мониторинга объектов окружающей среды на содержание ФОВ;

2) разработка БС для диагностирования поражения ФОВ.

Диагностирование с использованием известных биосенсоров предусматривало проведение анализа проб крови после антидотной терапии пострадавшего.

В полевых условиях при поражении ФОВ более целесообразна неинвазивная диагностика с применением наиболее простых по устройству и удобных в эксплуатации биосенсоров.

Основное требование к биосенсорам нейротоксинов – обеспечение высокой чувствительности, специфичности и быстродействия. Актуальность обсуждаемой задачи стимулировала исследования, посвященные повышению чувствительности биосенсора нейротоксинов.

Предложены подходы к решению данной задачи на основе известных ранее литературных данных:

1. Оптические бессубстратные биосенсоры с флуоресцентной меткой (флуорогеном) на основе флуоресцентного метода регистрации аналитического сигнала можно отнести к числу наиболее чувствительных и быстродействующих.

2. Особый интерес представляют флуорогены – обратимые ингибиторы, являющиеся активаторами фосфорилирования холинэстераз.

3. Известен ряд флуорогенов-активаторов (активаторов) фосфорилирования холинэстераз.

4. Исследовано влияние БХЭ на флуоресценцию обратимых ингибиторов-флуорофоров [5].

Эти данные были использованы для разработки экспресс-метода определения ингибиторов БХЭ.

Действительно, введение не флуоресцирующего ингибитора $I_{нефл}$, характеризующегося более высоким сродством к ферменту (или при его существенно более высокой концентрации), приведет к смещению равновесия в системе и освобождению ингибитора-флуорофора в соответствии с рисунком 1:

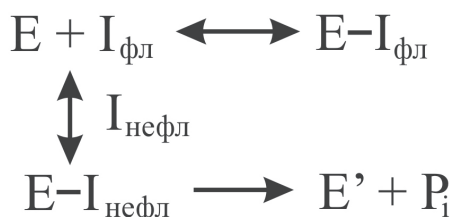


Рис. 1. E – БХЭ, $I_{фл}$ – обратимый флуорофор-ингибитор, $E-I_{фл}$ – комплекс БХЭ с обратимым ингибитором-флуорофором, $I_{нефл}$ – не флуоресцирующий ингибитор, $E-I_{нефл}$ – комплекс БХЭ с не флуоресцирующим ингибитором, E' – фосфорилированная БХЭ, P_i – продукт, выделившийся после фосфорилирования БХЭ.

В случае введения в систему не флуоресцирующего необратимого ингибитора ($I_{необ}$), например, фосфорорганического инсектицида, будет иметь место дальнейшее смещение равновесия в сторону образования фосфорилированной БХЭ. Флуоресценция системы при этом также будет снижаться более интенсивно.

Выбор флуорофора-ингибитора в данном исследовании проводился в соответствии со следующими требованиями: флуорофор должен быть относительно сильным ингибитором БХЭ, обладать высоким квантовым выходом, хорошо растворяться в водных средах в интервале физиологических значений рН.

Флуорофором-ингибитором, отвечающим данным требованиям, является комплекс бромид-3,8-диамино-5-этил-6-фенилфенантридиния (бромид этидия) с БХЭ.

Материалы и методы исследования. В качестве флуорофора-ингибитора использовали бромид этидия (*Ethidium bromide*) фирмы *Sigma-Aldrich*, в качестве фосфорорганического нейротоксина использовали параоксон (*Paraoxon-ethyl*) фирмы *Sigma-Aldrich*, в качестве фермента использовали ацетилхолинэстеразу из эритроцитов быка (*Acetylcholinesterase, type XII-S*) фирмы *Sigma-Aldrich*. Спектры флуоресценции регистрировали с помощью спектрофлуориметра МРФ-4 фирмы *Hitachi*.

Результаты и обсуждение. Бромид этидия имеет ряд преимуществ по сравнению с известными флуорогенами, образующими флуоресцирующие комплексы с ХЭ:

1) его полоса флуоресценции находится в красной области спектра ($\lambda_{макс} = 610$ нм), удаленной от полос флуоресценции триптофана и других ароматических аминокислот, что вносит вклад в повышение специфичности анализа (рис. 2);

2) образует интенсивно флуоресцирующие комплексы не только с АХЭ эритроцитов человека, но и с АХЭ эритроцитов быка, БХЭ человека и лошади, а также пропионилхолинэстеразой зрительных ганглиев кальмара;

3) образует с холинэстеразами комплексы, положение полос поглощения и флуоресценции (рис. 2) которых отличается от соответствующих полос самого бромид этидия, что обеспечивает повышение специфичности определения аналита;

4) образование с холинэстеразами комплексов, положение полос поглощения и флуоресценции которых отличается от соответствующих полос самого бромид этидия (рис. 2), открывает перспективу использования для регистрации аналитического сигнала метода резонансного переноса энергии флуоресценции – одного из самых чувствительных методов измерения интенсивности флуоресценции.

Для проведения исследований по разработке целевого способа диагностики в данной работе был использован оптический биосенсор необратимых ингибиторов холинэстеразы в воздухе, активный компонент которого представляет собой интенсивно флуоресцирующий комплекс бромид этидия с БХЭ лошади, иммобилизованный на твердой подложке золь-гель методом [7].

Именно благодаря включению бромид этидия в состав аналитической рецептуры активного компонента совместно с БХЭ данный биосенсор характеризуется высокой специфичностью и чувствительностью к ФОВ. Существенным преимуществом биосенсора также является ли-

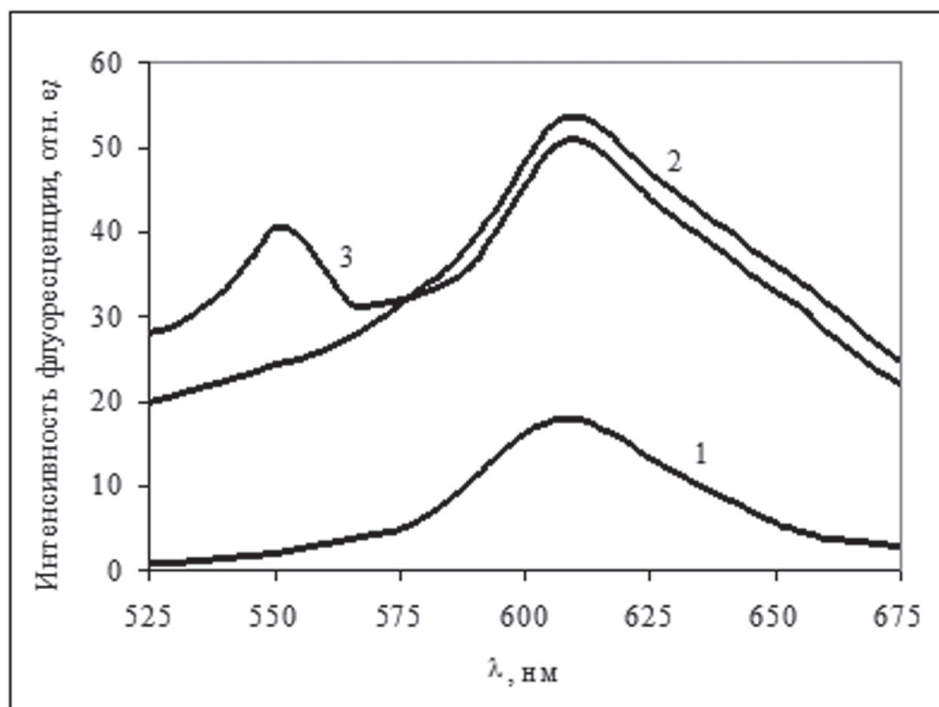


Рис. 2. Спектры флуоресценции: 1 – бромид этидий (0,6 мкмоль/л); 2 и 3 – комплекс бромида этидия с БХЭ лошади (0,36 Е/мл и 0,50 Е/мл соответственно); возбуждение: $\lambda = 470$ нм.

Таблица

Результаты определения параоксона биосенсором, $n = 10$

Эталонный раствор слюны	Определено биосенсором
Концентрация параоксона в эталонном растворе слюны, мкМ	Концентрация параоксона, мкМ
1,00	$0,87 \pm 0,10$
10,00	$9,20 \pm 1,05$

нейная зависимость снижения интенсивности флуоресценции $I_{\text{фл}}$ на длине волны $\lambda = 550$ нм от концентрации фосфорорганического инсектицида параоксона (x , мкМ), которая может быть представлена следующим уравнением:

$$I_{\text{фл}} \text{ (отн. ед.)} = (72,6 \pm 1,4) - (5,5 \pm 0,1) x, \quad (1)$$

$$R^2 = 0,95, n = 5.$$

Следовательно, уравнение (1) может служить дозиметром при определении нейротоксина данным биосенсором.

В данной работе биосенсор был дополнительно снабжен устройством, через которое анализируемая проба (например, слюна пораженного человека), содержащая нейротоксин, может входить в контакт с активным компонентом биосенсора.

При моделировании авторами данного исследования диагностики поражения нейроток-

сином в полевых условиях путем нанесения на активный компонент биосенсора слюны, содержащей фосфорорганический инсектицид параоксон, наблюдалось снижение интенсивности флуоресценции биосенсора на длине волны 550 нм. Аналитический отклик достигался за 15 – 30 секунд.

Приведенные в таблице данные, подтверждают правильное и точное определение наличия параоксона в анализируемой пробе слюны. Таким образом, можно сделать заключение о высокой чувствительности и малом времени формирования аналитического отклика при использовании для анализа данного биосенсора.

Заключение. В результате проведенных исследований авторами показано, что предложенный способ неинвазивной диагностики поражения со-

единениями нервно-паралитического действия в клинических и полевых условиях с применением ОБС необратимых ингибиторов холинэстеразы в воздухе, дополнительно снабженного устройством, через которое анализируемая проба, со-

держащая нейротоксин (например, слюну), может входить в контакт с активным компонентом биосенсора, отвечает современным требованиям по чувствительности и времени формирования аналитического сигнала.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гаврилко-Алексеев А. Крупнейшие случаи применения химического оружия в истории. Available at: <https://www.rbc.ru/photoreport/07/04/2017/58e76c2a9a7947528d57950f>. Дата обращения: 1.07.2020.

2. Rodney Muhumuza. Non-invasive malaria test wins Africa engineering prize. Available at: <https://medicalxpress.com/news/2018-06-non-invasive-malaria->

Africa-prize.html. Дата обращения: 1.07.2020.

3. Hall C.A., Chilcott R.P. Eyeing up the Future of the Pupillary Light Reflex in Neurodiagnostics. *Diagnostics*. 2018, 8(1), 19; doi:10.3390/diagnostics8010019.

4. Kori R.K., Jain A.K., Yadav R.S. Biomarkers: An Essential Gizmo in Pesticide Toxicity. *Biomark J*. 2016, 2:1.

DOI: 10.21767/2472-1646.100009.

5. Gainullina E.T., Gulikova D.K., Korneev D.O., Oreshkin D.V., Ryzhikov S.B., Fateenkov V.N. Biosensors as tools of environmental monitoring for organophosphorus nerve agents. *Journal of Analytical Chemistry*. 2015; V. 70, No. 7. P. 771-780.

6. Fourth Meeting of the Scientific Advisory Board Temporary Working Group on the

Convergence of Chemistry and Biology. 5-7 November 2013. –Hague. – 2013.

7. Гайнуллина Э.Т., Корнеев Д.О., Фатеенков В.Н. Оптический биосенсор необратимых ингибиторов холинэстеразы в воздухе. Патент РФ № 2654294, Государственная регистрация РФ 17 мая 2018.

REFERENCES:

1. Gavrilko-Alekseev A. The largest cases of the use of chemical weapons in history. Available at: <https://www.rbc.ru/photoreport/07/04/2017/58e76c2a9a7947528d57950f>. (Accessed 1 July 2020) (in Russian)

2. Rodney Muhumuza. Non-invasive malaria test wins Africa engineering prize. Available at: <https://medicalxpress.com/>

news/2018-06-non-invasive-malaria-Africa-prize.html. (Accessed 1 July 2020).

3. Hall C.A., Chilcott R.P. Eyeing up the Future of the Pupillary Light Reflex in Neurodiagnostics. *Diagnostics*. 2018, 8(1): 19; doi:10.3390/diagnostics8010019.

4. Kori R.K., Jain A.K., Yadav R.S. Biomarkers: An Essential Gizmo in

Pesticide Toxicity. *Biomark J*. 2016, 2:1. DOI: 10.21767/2472-1646.100009.

5. Gainullina E.T., Gulikova D.K., Korneev D.O., Oreshkin D.V., Ryzhikov S.B., Fateenkov V.N. Biosensors as tools of environmental monitoring for organophosphorus nerve agents. *Journal of Analytical Chemistry*. 2015; V. 70 (7): 771-780.

6. Fourth Meeting of the Scientific Advisory Board Temporary Working Group on the Convergence of Chemistry and Biology. 5-7 November 2013. –Hague. – 2013.

7. Gainullina E.T., Korneev D.O., Fateenkov V.N. Optical biosensor of irreversible cholinesterase inhibitors in the air. Patent RF, N 2654294; 2018 (in Russian).

E.T. Gainullina¹, S.B. Ryzhikov², V.N. Fateenkov¹, M.A. Ponsov¹, L.V. Petrakova¹

METHOD OF NON-INVASIVE DIAGNOSTICS OF POISONING BY SUBSTANCES OF NEUROPARALYTIC ACTION WITH THE USE OF A BIOSENSOR IN CLINICAL AND FIELD CONDITIONS

¹27th Scientific Center of the Ministry of Defence of the Russian Federation, 105005, Moscow, Russian Federation

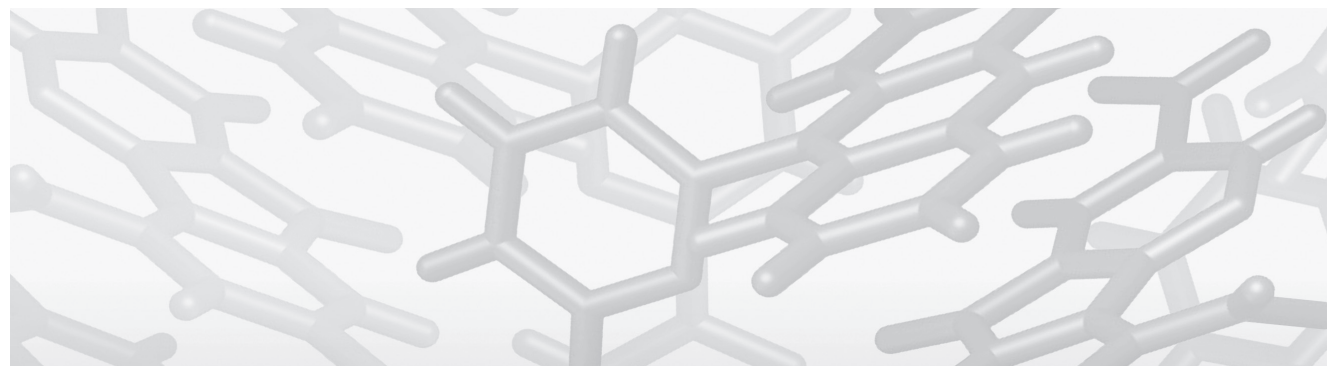
²Lomonocov Moscow State University, Faculty of Physics, 119991, Moscow, Russian Federation

The questions of substantiation of the need to create and the prospects of developing a method for non-invasive diagnosis of lesions by compounds of neuroparalytic action in the field that meet modern requirements for sensitivity, specificity and speed are considered. As a result of the research, a method for early and reliable non-invasive diagnosis of lesions by neuroparalytic compounds in the field using an optical biosensor of irreversible cholinesterase inhibitors was proposed.

Keywords: *non-invasive diagnostics, substances of neuroparalytic action, biosensor.*

Quote: E.T. Gainullina, S.B. Ryzhikov, V.N. Fateenkov, M.A. Ponsov, L.V. Petrakova. Method of non-invasive diagnostics of poisoning by substances of neuroparalytic action with the use of a biosensor in clinical and field conditions. *Toxicological Review*. 2021; 1:38-42.

Переработанный материал поступил в редакцию 17.07.2020 г.



ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ ТОКСИКОЛОГИЯ

УДК 574.24+615.916

DOI: 10.36946/0869-7922-2021-1-43-46.

ТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ МЕДИ, КАДМИЯ И СВИНЦА НА СВОБОДНОЖИВУЩИХ ПОЧВЕННЫХ НЕМАТОД *CAENORHABDITIS ELEGANS* И *CAENORHABDITIS BRIGGSAE*

А.В. Егорова,
Т.Б. Калининкова,
Р.Р. Шагидуллин

Институт проблем экологии и
недропользования Академии
наук Республики Татарстан
(обособленное подразделение
ГНБУ «Академия наук Республики
Татарстан»), 420087, г. Казань,
Российская Федерация

Тяжелые металлы являются одними из самых распространенных загрязнителей окружающей среды. Целью работы явилась проверка гипотезы, предполагающей, что одним из механизмов токсического действия меди, свинца и кадмия на организмы беспозвоночных является адаптивная активация холинергической синаптической трансмиссии. В экспериментах с двумя видами свободноживущих почвенных нематод – *Caenorhabditis elegans* и *Caenorhabditis briggsae* – показано, что ионы Cu^{2+} , Cd^{2+} и Pb^{2+} в концентрации 60 и 120 мкМ усиливали негативное действие агониста никотиновых рецепторов ацетилхолина левамизола на организм нематод. При совместном действии левамизола и тяжелых металлов на организм *C. elegans* и *C. briggsae* сокращалось среднее время наступления паралича нематод – полной потери способности к плаванию. Результаты работы показывают, что нематоды *C. elegans* и *C. briggsae* могут использоваться в качестве модельных организмов при изучении механизмов токсического действия тяжелых металлов.

Ключевые слова: *Caenorhabditis elegans*, *Caenorhabditis briggsae*, никотиновые рецепторы ацетилхолина, левамизол, токсическое действие меди, свинца и кадмия.

Цит: А.В. Егорова, Т.Б. Калининкова, Р.Р. Шагидуллин. Токсическое действие меди, кадмия и свинца на организмы свободноживущих почвенных нематод *Caenorhabditis elegans* и *Caenorhabditis briggsae*. Токсикологический вестник. 2021; 1:43-46.

Введение. Тяжелые металлы являются одними из самых распространенных загрязнителей окружающей среды. Несмотря на большое количество данных об острой и хронической токсичности тяжелых металлов для животных разных таксономических групп и для человека, накопленных к настоящему времени, вопрос о механизмах негативного действия этих токсикантов во многом остается открытым. Общим механизмом токсичности всех тяжелых металлов является их способность вызывать окислительный стресс образованием реактивных форм кислорода в организме [1–2]. Известно также, что тяжелые метал-

лы могут влиять на синаптическую трансмиссию и вызывать нейродегенерацию [1, 3]. Одной из поведенческих реакций животного на действие токсиканта является избегание неблагоприятной среды [4]. Эта реакция хорошо изучена у свободноживущей почвенной нематоды *Caenorhabditis elegans*. *C. elegans* в настоящее время широко используется в качестве модельного организма для токсикологических исследований и обладает целым рядом преимуществ перед млекопитающими. К этим преимуществам относятся маленькие размеры тела, короткий жизненный цикл, простота и дешевизна культивирования в лаборатор-

Егорова Анастасия Васильевна (Egorova Anastasia Vasil'evna), младший научный сотрудник лаборатории экспериментальной экологии Института проблем экологии и недропользования Академии наук Республики Татарстан, egorovanastassia@gmail.com;
Калининкова Татьяна Борисовна (Kalinnikova Tatiana Borisovna), кандидат биологических наук, заведующая лабораторией экспериментальной экологии Института проблем экологии и недропользования Академии наук Республики Татарстан, tbkalinnikova@gmail.com;
Шагидуллин Рифгат Роальдович (Shagidullin Rifgat Roal'dovich), доктор химических наук, член-корреспондент АН РТ, директор Института проблем экологии и недропользования Академии наук Республики Татарстан, shagidullin@mail.ru.

рии, простота строения тела и безопасность организма для исследователей [1, 5]. Нервная система у гермафродитов *C. elegans* состоит всего из 302 нейронов, более половины которых являются холинергическими [6]. Целью работы явилась проверка гипотезы, предполагающей, что механизм токсического действия ионов Cu^{2+} , Cd^{2+} и Pb^{2+} на организм *C. elegans* является адаптивная активация холинергической синаптической трансмиссии. Дополнительно было проведено сравнительное исследование токсического действия ионов Cu^{2+} , Cd^{2+} и Pb^{2+} на организм близкородственного *C. elegans* вида почвенных нематод *Caenorhabditis briggsae*.

Материалы и методы исследования. Эксперименты проводили в июне – июле с нематодами *C. elegans* линии дикого типа N2 и *C. briggsae* линии дикого типа AF16, предоставленными *Caenorhabditis Genetics Center*. Нематод выращивали при 22°C в чашках Петри со стандартной средой выращивания (3 г/л NaCl, 17 г/л бактоагар, 2,5 г/л бактопептон, 5 мг/л холестерин, 1 мМ CaCl_2 , 1 мМ MgSO_4 , 25 мМ калийфосфатного буфера (pH = 6.0)) при кормлении *E. coli* OP50 [5]. Эксперименты проводили с нематодами трехдневного возраста, инкубированными индивидуально в 1 мл NG буфера (3 г/л NaCl, 1 мМ CaCl_2 , 1 мМ MgSO_4 , и 25 мМ калийфосфатного буфера (pH=7.0)) [5] с добавлением $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ или $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ при 22°C. В качестве критерия токсического действия ионов Pb^{2+} , Cd^{2+} и Cu^{2+} на организм *C. elegans* и *C. briggsae* было выбрано среднее время наступления паралича нематод. Паралич проявлялся в полной потере нематодами способности к плаванию, индуцированному механическим стимулом. Паралич нематод регистрировали с использованием стереоскопического микроскопа SMZ-05. Эксперименты проводили в трех повторностях с использованием 30 нематод в каждом варианте. Статистическую обработку результатов проводили с использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Для проверки предположения о том, что ионы Cu^{2+} , Cd^{2+} и Pb^{2+} активируют в организме *C. elegans* и *C. briggsae* холинергическую синаптическую трансмиссию нами были проведены эксперименты, в которых исследовалось влияние ионов Cu^{2+} , Cd^{2+} и Pb^{2+} на чувствительность локомоции нематод к токсическому действию агониста никотиновых рецепторов ацетилхолина (н-холинорецепторов) левамизола. Особенностью организма почвенных нематод рода *Caenorhabditis* является низкая проницаемость кутикулы для веществ из окружающей среды. Поэтому негативный эффект токсикантов на организм *C. elegans* проявляется либо при действии очень высоких их концентраций, либо при длительной (несколько часов) инкубации нематод в среде с токсикантами [1].

В наших экспериментах левамизол в концентрациях 60 и 120 мкМ вызывал паралич нематод. Среднее время наступления паралича при действии левамизола варьировало от 88,2 до 107,6 мин у *C. elegans* и от 60,0 до 73,4 мин у *C. briggsae* (табл. 1–3). Тяжелые металлы в концентрации 60 и 120 мкМ не вызывали паралич нематод в течение 240 мин. Ионы Cu^{2+} , Cd^{2+} и Pb^{2+} усиливали токсическое действие левамизола на организм *C. elegans* и *C. briggsae*, что проявлялось в уменьшении времени наступления паралича нематод при совместном действии ионов металлов и левамизола (табл. 1–3). Добавление в среду инкубации *C. elegans* с левамизолом ионов Cu^{2+} , Cd^{2+} и Pb^{2+} снижало время наступления паралича до 65,6–101,2 мин. При совместном действии ионов Cu^{2+} , Cd^{2+} и Pb^{2+} и левамизола на организм *C. briggsae* паралич нематод проявлялся уже через 33,8–73,4 мин (табл. 1–3).

Одной из основных мишеней токсического действия тяжелых металлов на организм животных является нервная система [1, 3]. Хорошо известно нейротоксическое действие тяжелых металлов и их влияние на когнитивные функции нервной системы [1, 3, 7]. Тяжелые металлы могут оказывать прямое действие на ионные каналы в мембранах

Таблица 1

Влияние свинца на чувствительность *C. elegans* и *C. briggsae* к левамизолу

	Среднее время наступления паралича нематод, мин			
	<i>Caenorhabditis elegans</i>		<i>Caenorhabditis briggsae</i>	
	Левамизол, мкМ		Левамизол, мкМ	
	60	120	60	120
Без металлов	95,3±1,7	95,2±1,6	62,8±1,1	60,0±1,9
60 мкМ $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$	96,8±1,9	87,8±1,8**	54,3±1,7***	44,1±0,9***
120 мкМ $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$	88,7±1,9**	65,6±1,2***	49,7±0,8***	33,8±0,7***

Примечание: *** – достоверность разницы между контролем (среда без свинца) и опытом (среда с добавлением свинца). ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$

Таблица 2

Влияние меди на чувствительность *C. elegans* и *C. briggsae* к левамизолу

	Среднее время наступления паралича нематод, мин			
	<i>Caenorhabditis elegans</i>		<i>Caenorhabditis briggsae</i>	
	Левамизол, мкМ		Левамизол, мкМ	
	60	120	60	120
Без металлов	107,6±2,4	95,2±1,8	87,1±1,3	72,2±1,4
60 мкМ Cu(NO ₃) ₂	101,2±2,2**	92,3±1,6**	65,6±1,7***	64,7±1,2***
120 мкМ Cu(NO ₃) ₂	99,5±2,9**	90,0±1,4***	73,1±1,6***	45,9±0,6***

Примечание: *** – достоверность разницы между контролем (среда без меди) и опытом (среда с добавлением меди).
** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$

Таблица 3

Влияние кадмия на чувствительность *C. elegans* и *C. briggsae* к левамизолу

	Среднее время наступления паралича нематод, мин			
	<i>Caenorhabditis elegans</i>		<i>Caenorhabditis briggsae</i>	
	Левамизол, мкМ		Левамизол, мкМ	
	60	120	60	120
Без металлов	97,7±2,8	88,2±2,3	73,4±2,8	60,6±1,8
60 мкМ Cd(NO ₃) ₂	78,4±1,9***	72,5±2,7***	61,5±2,1***	50,3±1,4***
120 мкМ Cd(NO ₃) ₂	84,3±2,2***	74,2±2,6***	55,3±1,7***	48,0±0,9***

Примечание: *** – достоверность разницы между контролем (среда без кадмия) и опытом (среда с добавлением кадмия).
*** – $p < 0,001$

нейронов [8, 9]. Кроме этого тяжелые металлы вызывают образование реактивных форм кислорода, вызывающих нейродегенерацию [1, 2]. *C. elegans* является удобным модельным организмом для изучения дегенерации нейронов при длительном действии тяжелых металлов на организм. При этом нельзя исключать острое токсическое действие тяжелых металлов на организм *C. elegans*, приводящее к изменению функций нейронов.

Важной функцией нервной системы является восприятие информации об изменениях окружающей среды и формирование адаптивных реакций организма. Ключевую роль в регуляции функций организма *C. elegans* играет холинергическая система, поскольку более половины из 302 нейронов этой нематоды используют ацетилхолин в качестве нейромедиатора [6]. Выявленная в этой работе активация холинергической системы *C. elegans* и *C. briggsae* ионами Cu²⁺, Cd²⁺ и Pb²⁺ может быть как следствием токсического действия этих ионов на холинергические нейроны, так и адаптивной реакцией организма на появление токсикантов в окружающей среде. Второе из этих объяснений более вероятно, поскольку в наших экспериментах ионы Cu²⁺, Cd²⁺ и Pb²⁺ не вызывали паралича нема-

тод даже после четырехчасовой инкубации в среде, содержащей 60 или 120 мкМ этих ионов. Это свидетельствует об отсутствии острой токсичности ионов Cu²⁺, Cd²⁺ и Pb²⁺ для *C. elegans* и *C. briggsae*.

Принято считать, что активация холинергической синаптической трансмиссии является механизмом увеличения скорости локомоции для избегания потенциально опасных условий среды. Известно, что избегание нематодами сред с высоким содержанием ионов Cu²⁺, Cd²⁺ и Pb²⁺ индуцируется этими ионами не в результате их проникновения во внутреннюю среду организма, а вследствие активации ноцицептивных сенсорных нейронов [4]. Локомоция нематод регулируется сложной сетью нейронов, включающей в себя командные нейроны, холинергические интернейроны AVA, AVB, AVD и PVC, холинергические моторные нейроны и ГАМК-ергические моторные нейроны, которые иннервируются холинергическими моторными нейронами [7, 10]. Известно, что у *C. elegans* адаптивная реакция избегания сред с высоким содержанием ионов Cu²⁺ и Cd²⁺ индуцируется активацией полимодальных ноцицептивных нейронов ADL, ASE и ASH [9, 11]. Сигналы из этих нейронов могут оказывать влияние на холинер-

гическую трансмиссию в системе нейронов, регулирующей плавание нематод. Следовательно, одним из возможных механизмов нарушения ионами Cu^{2+} , Cd^{2+} и Pb^{2+} локомоции нематод, включая полное отсутствие способности к плаванию, у *C. elegans* и *C. briggsae* может быть гиперактивация н-холинорецепторов в системе нейронов, регулирующей плавание, сигналами из ноцицептивных нейронов, активируемых тяжелыми металлами.

Ранее нами была показана более высокая, по сравнению с *C. elegans*, чувствительность нематоды *C. briggsae* к действию агонистов н-холинорецепторов [12]. Исходя из этого можно было предположить более сильное влияние ионов Cu^{2+} , Cd^{2+} и Pb^{2+} на токсичность левамизола для *C. briggsae*. Результаты экспериментов, в которых исследовалось влияние ионов Cu^{2+} , Cd^{2+} и Pb^{2+} на чувствительность *C. briggsae* к токсическому действию левамизола, подтвердили эту гипотезу. При добавлении тяжелых металлов в среду инкубации нематод с левамизолом время наступления паралича у

C. elegans уменьшается на 9–14% по сравнению со средой без ионов Cu^{2+} , Cd^{2+} и Pb^{2+} , а время наступления паралича *C. briggsae* снижается более чем на 20% (табл. 1–3). Это позволяет сделать вывод о том, что холинергическая система *C. briggsae* более чувствительна не только к действию агонистов н-холинорецепторов, но и к действию ионов Cu^{2+} , Cd^{2+} и Pb^{2+} .

Закключение. Результаты наших экспериментов позволяют сделать вывод о том, что экспозиция *C. elegans* и *C. briggsae* к ионам Cu^{2+} , Cd^{2+} и Pb^{2+} в концентрации 60 и 120 мкМ повышает чувствительность моторной программы плавания нематод, индуцированного механическим стимулом, к гиперактивации н-холинорецепторов левамизолом.

Результаты нашей работы показывают, что почвенные нематоды *C. elegans* и *C. briggsae* могут использоваться в качестве модельных организмов для изучения механизмов токсического действия тяжелых металлов на организмы беспозвоночных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/REFERENCES

1. Chen P., Martinez-Finley E.J., Bomhorst J., Chakraborty S., Aschner M. Metal-induced neurodegeneration in *C. elegans*. *Front. Aging Neurosci.* 2013; 5: 1–11.
2. Valko M., Morris H., Cronin M.T.D. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr. Med. Chem.* 2005; 12: 1161–1208.
3. Sanders T., Liu Y., Buchner V., Tchounwou P.B. Neurotoxic effects and biomarkers of lead exposure: A review. *Rev. Environ. Health.* 2009; 24: 15–45.
4. Sambongi Y., Nagae T., Liu Y., Yoshimizu T., Takeda K., Wada Y. et al. Sensing of cadmium and copper ions by externally exposed ADL, ASE, and ASH neurons elicits avoidance response in *Caenorhabditis elegans*. *NeuroReport.* 1999; 10: 753–757.
5. Brenner S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics.* 1974; 77: 71–94.
6. Pereira L., Kratsios P., Serrano-Saiz E., Sheftel H., Mayo A.E., Hall D.H. et al. A cellular and regulatory map of the cholinergic nervous system of *C. elegans*. *eLife.* 2015; 4: e12432.
7. Wang Bo, Du Y. Cadmium and its neurotoxic effect. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2013; 2013: 1–12.
8. Vijverberg H.P.M., Oortgiesen M., Leinders T., van Kleef R.G.D.M. Metal interactions with voltage- and receptor-activated ion channels. *Environ. Health. Perspect.* 1994; 102 (Suppl. 3): 153–158.
9. Zhang Y., Ye B., Wang D. Effects of metal exposure on associative learning behavior in nematode *Caenorhabditis elegans*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2010; 59: 129–136.
10. Leung M.C.K., Williams P.L., Benedetto A., Au K., Helmcke K.J., Aschner M. et al. *Caenorhabditis elegans*: an emerging model in biomedical and environmental toxicology. *Toxicol. Sci.* 2008; 106: 5–28.
11. Hilliard M.A., Apicella A.J., Kerr R., Suzuki H., Bazzicalupo P., Schafer W.R. In vivo imaging of *C. elegans* ASH neurons: cellular response and adaptation to chemical repellents. *The EMBO J.* 2005; 24: 63–72.
12. Kalinnikova T.B., Kolsanova R.R., Belova E.B., Shagidullin R.R., Gainutdinov M.Kh. Opposite responses of the cholinergic nervous system to moderate heat stress and hyperthermia in two soil nematodes. *J. Therm. Biol.* 2016; 62: 37–49.

A.V. Egorova, T.B. Kalinnikova, R.R. Shagidullin

TOXIC ACTION OF COPPER, CADMIUM AND LEAD ON FREE-LIVING SOIL NEMATODES *CAENORHABDITIS ELEGANS* AND *CAENORHABDITIS BRIGGSAE*

Research Institute for Problems of Ecology and Mineral Wealth Use of Tatarstan Academy of Sciences, 420087, Kazan, Russian Federation

Heavy metals are one of the most common pollutants in environment. The aim of this work was to test the hypothesis assuming that one of mechanisms of toxic action of copper, cadmium and lead on invertebrates' organisms is adaptive activation of cholinergic synaptic transmission. In experiments with two free-living soil nematodes, namely *Caenorhabditis elegans* and *Caenorhabditis briggsae*, it has been shown that Cu^{2+} , Cd^{2+} and Pb^{2+} ions at concentrations of 60 and 120 μM enhanced the negative effects of the nicotinic acetylcholine receptors agonist levamisole on the nematodes' organisms. Under combined action of levamisole and heavy metals on organisms of *C. elegans* and *C. briggsae* the mean time of nematodes paralysis (complete loss of the ability to swim) was reduced. The results of this work show that nematodes *C. elegans* and *C. briggsae* can be used as model organisms to study mechanisms of toxic action of heavy metals.

Keywords: *Caenorhabditis elegans*, *Caenorhabditis briggsae*, nicotinic acetylcholine receptors, levamisole, toxic action of copper, lead and cadmium.

Quote: A.V. Egorova, T.B. Kalinnikova, R.R. Shagidullin. Toxic action of copper, cadmium and lead on free-living soil nematodes *Caenorhabditis elegans* and *Caenorhabditis briggsae*. *Toxicological Review.* 2021; 1:43-46.

Переработанный материал поступил в редакцию 04.02.2021 г.

НОВЫЕ СВЕДЕНИЯ О ТОКСИЧНОСТИ И ОПАСНОСТИ ХИМИЧЕСКИХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ

УДК 615.015:615.28

DOI: 10.36946/0869-7922-2021-1-47-51.

ИССЛЕДОВАНИЕ ОБЩЕТОКСИЧЕСКИХ СВОЙСТВ СУБСТАНЦИИ ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНОГО ПРЕПАРАТА ТИОЗОНИД

А.Ю. Савченко², М.С. Буренков³,
П.С. Байдин³, Г.В. Раменская¹, В.Г. Кулес⁴

¹ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М.Сеченова
Минздрава России (Сеченовский Университет),
119991, г. Москва, Российская Федерация

²ФГБУН «Научный центр биомедицинских
технологий ФМБА России», 143442, Московская
область, п. Светлые горы, Российская Федерация

³АО «Фарм-Синтез, 111024, г. Москва, Российская
Федерация

⁴Филиал «Клиническая фармакология» ФГБУН
«Научный центр биомедицинских технологий
ФМБА России», 109240, г. Москва, Российская
Федерация

Цель исследования состояла в оценке субхронической и хронической токсичности субстанции препарата тиозонид в экспериментах на кроликах и крысах. Животные получали дозы, от эквивалента терапевтической до до превышающей ее в 75 раз. Препарат в изученных дозах не вызывал достоверных изменений в приросте массы тела животных, поведенческих реакциях, потреблении пищи и воды. Не было отмечено изменений в биохимическом и клеточном составе периферической крови, белоксинтезирующей функции печени, углеводном обмене, функциональном состоянии сердечно-сосудистой системы. В работе центральной нервной системы отмечено некоторое снижение двигательной активности у крыс-самцов, длительно получавших лекарственную субстанцию в дозе 100 мг/кг (более, чем в 10 раз, превышающей терапевтическую дозу). Отмечено местное раздражающее действие в ЖКТ подопытных крыс по результатам гистологических исследований, наиболее выраженное под воздействием препарата в дозе 100 мг/кг. По результатам гистологических исследований обнаружены незначительные дистрофические изменения в печени, почках и миокарде у части животных под влиянием лекарственной субстанции в дозе 100 мг/кг. Таким образом, действующее вещество противотуберкулезного препарата не обладает токсическими свойствами, лимитирующими его длительный прием, что позволяет рассматривать его в качестве перспективного средства для включения в базовые длительные курсы лечения заболевания.

Ключевые слова: тиозонид, субхроническая и хроническая токсичность, кролики, крысы.

Цит: А.Ю. Савченко, М.С. Буренков, П.С. Байдин, Г.В. Раменская, В.Г. Кулес. Исследование общетоксических свойств субстанции противотуберкулезного препарата тиозонид. Токсикологический вестник. 2021; 1:47-51.

Введение. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) поставила цель до 2030 года остановить эпидемию туберкулеза [1]. Несмотря на явные позитивные сдвиги в борьбе с этим заболеванием, осложняющим фактором можно

считать рост количества случаев туберкулеза с множественной, широкой и полной лекарственной устойчивостью возбудителя к известным противотуберкулезными препаратами (ПТП) [2, 3]. В Китае, Индии и ряде стран Восточной Ев-

Савченко Алла Юрьевна (Savchenko Alla Yuryevna), ведущий научный сотрудник лаборатории фармакомоделирования ФГБУН НЦБМТ ФМБА России, alursav@mail.ru;

Буренков Михаил Сергеевич (Burenkov Mikhail Sergeevich), кандидат биологических наук, менеджер по доклиническим исследованиям АО «Фарм-Синтез», mburenkov@pharm-sintez.ru;

Байдин Петр Сергеевич (Baidin Petr Sergeevich), кандидат медицинских наук, руководитель медицинского отдела АО «Фарм-Синтез», pbaidin@pharm-sintez.ru;

Раменская Галина Владиславовна (Ramenskaya Galina Vladislavovna), доктор фармацевтических наук, профессор, директор Института фармации ФГАОУ ВО Первого МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), ramenskaia@mail.ru;

Кулес Владимир Григорьевич (Kukes Vladimir Grigorievich), доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, Филиал «Клиническая фармакология» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России, Elmed@yandex.ru

ропы доля туберкулеза с полной лекарственной устойчивостью достигает 47% [4, 5]. Биологически обоснованной является роль нежелательных побочных реакций, развивающихся на фоне приема ПТП в формировании полирезистентности возбудителя к терапии. Показано, что в 21 % эти реакции служат основанием для отмены ПТП, что чревато риском роста устойчивости возбудителя [6, 7].

Разработка новых лекарственных средств, проявляющих специфическую противотуберкулезную активность, является насущной задачей фармакологии. Тиозонид – инновационное противотуберкулезное лекарственное средство из группы диарилхинолинов [8]. Было показано, что противотуберкулезная активность тиозонида в монотерапии на модели генерализованного туберкулеза у мышей сравнима с таковой препарата 2-го ряда рифампицином, отмечен ярко выраженный синергизм при совместном действии с изониазидом и рифампицином. Сочетание этих факторов приводило к практически полному излечению животных в течение двухмесячного курса терапии [9]. В этой связи *актуальным являлось исследование* общетоксических свойств субстанции тиозонида в субхроническом и хроническом экспериментах.

Материалы и методы исследования. По химической структуре изучаемая субстанция представляет собой {1R,2S+1S,2R}-1-(6-Бром-2-хлорхинолил-3-ил)-4-(диметиламино)-2-(нафталин-1-ил)-1-фенилбутан-2-ол. За молекулой закреплено рабочее название тиозонид. Рекомендуемая терапевтическая доза для человека (ТДЧ) – 100 мг. Межвидовой расчёт доз для подопытных животных проводили по Freireich E.J. [10]. Исследуемое вещество вводили внутрижелудочно ежедневно в виде 1% водного раствора, контрольные животные получали воду.

Субхроническую токсичность субстанции тиозонида изучали в течение 30 дней в экспериментах на кроликах обоего пола породы Шиншилла весом 2500 г. В опыте 18 животных (9 самок и 9 самцов) поровну распределили в 3 группы по 3 самки и 3 самца в каждой. Животным первой группы тиозонид вводили в дозе 28,5 мг/кг (в 7,5 раз превышает эквивалент ТДЧ при пересчете с учетом межвидовых различий по Freireich E.J.), второй – в дозе 285 мг/кг (в 75 превышает эквивалент ТДЧ), третью группу составили контрольные животные. Токсичность вещества оценивали по выживаемости, общему виду, состоянию и поведению животных, динамике массы тела. О местном раздражающем действии в ходе эксперимента судили по изменениям структуры тканей отделов желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) – желудка и кишечника. До начала и в конце эксперимента исследовали морфологический состав

периферической крови, уровень гемоглобина, биохимические показатели сыворотки крови: уровень общего белка, глюкозы, активность ферментов аспартатаминотрансферазы (АСТ), аланинаминотрансферазы (АЛТ), щелочной фосфатазы (ЩФ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ). После окончания эксперимента кроликов умерщвляли с помощью передозировки наркоза. Вскрытие животных производили сразу после их гибели по полной патологоанатомической схеме.

Хроническая токсичность изучена в течение 6 месяцев на нелинейных белых крысах-самцах со средней массой 283±5 г и крысах-самках массой 227±4 г. В ходе исследования подопытные животные получали дозы изучаемой субстанции в эквиваленте ТДЧ при пересчете с учетом межвидовых различий по Freireich E.J., а также в 6 и 12 раз превышающие таковую. Животные были распределены на 7 групп по 15 голов в каждой в соответствии с назначением: самцы – в группы, получавшие 10, 50, 100 мг/кг тиозонида и контроль (группы 1-4 соответственно); самки – в группы, получавшие 10 и 100 мг/кг тиозонида и контроль (группы 5-7 соответственно).

В начале исследования, через 1, 3 и 6 месяцев регистрировали показатели состояния животных. Общее состояние подопытных животных оценивали по внешнему виду, поведенческим реакциям и интегральным показателям (потребление корма и воды, динамика массы тела). Состояние сердечно-сосудистой системы изучали с помощью электрокардиографии (ЭКГ) во втором стандартном отведении без наркоза. Изучали действие субстанции тиозонида на состав периферической крови, функции печени, мочевыделительной систем согласно общепринятым методикам. Функцию нервной системы оценивали методом спонтанной двигательной активности, которая регистрировалась с помощью актометра фирмы «Ugo Basile», и по суммационно-пороговому показателю. По завершению эксперимента подопытных животных умерщвляли, вскрывали, определяли относительную массу органов, проводили патоморфологические исследования [11].

Полученные данные подвергались статистической обработке при помощи программы STATISTICA 6.0 for Windows. Для проверки достоверности различий качественных переменных использовали критерий χ^2 . Для проверки различий количественных показателей использовали непараметрический критерий Манна-Уитни (попарные сравнения несвязанных совокупностей данных), Вилкоксона (попарные сравнения несвязанных совокупностей данных). Если достигнутый уровень значимости различий не превышал 0,05, их считали достоверными [12, 13].

Результаты и обсуждение. *Субхроническая токсичность.* Согласно полученным результа-

там, все подопытные животные хорошо перенесли введение тиозонида в исследуемых дозах, гибели не наблюдалось. Повышенной или пониженной двигательной активности у подопытных животных сравнительно с контрольными группами у самцов и самок не отмечено. Мышечный тонус у подопытных животных и контрольных не отличался повышенной возбудимостью. Показатели веса, состояния шерстного покрова, вид глаз и ушей животных были в пределах нормы. Динамика массы тела во всех подопытных группах была положительная, и достоверно не отличалась от контроля. При анализе крови отмечено, что содержание гемоглобина, количество эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов во всех группах в пределах физиологической нормы.

Тиозонид в исследуемых дозах не влиял на уровень содержания общего белка и активность ЩФ, АСТ, АЛТ, ЛДГ сыворотки крови подопытных животных, что свидетельствует об отсутствии повреждающего действия изучаемого препарата на функцию печени.

При патоморфологическом исследовании были получены данные, показавшие эквивалентность состояния внутренних органов контрольных кроликов и животных, получавших тиозонид, за исключением следующих показателей. В гистологической картине печени на фоне длительного приема препарата в терапевтической дозе 28,5 мг/кг наблюдалось полнокровие и мелкокапельные жировые отложения в гепатоцитах. Желудок в этой группе животных характеризовался утолщением слизистой оболочки. В группе кроликов, получавших препарат в дозе 285 мг/кг, в картине печени отмечалось выраженное полнокровие и незначительные дистрофические изменения клеток. Слизистая желудка была утолщена, отмечалась гиперсекреция слизи.

Хроническая токсичность. По результатам исследования хронической токсичности изучаемой субстанции на крысах, такие интегральные показатели как прирост массы тела, суточное потребление сухого, влажного корма и воды не имели статистически значимых различий с контролем. Поведенческие реакции подопытных животных не отличались существенно от контрольных, за исключением группы крыс-самцов, получавших исследуемое вещество в дозе 100 мг/кг, превышающей ТДЧ в 10 раз (группа 3). Отмечено, что в этой группе изучаемое вещество достоверно влияло на двигательную активность крыс-самцов в течение всего эксперимента. Количество локомоций снизилось от 180,6±22,7 движений (фоновый показатель) до 49,2±9,9 через 3 месяца ($p<0,01$) и до 36,0±4,3 через 6 месяцев ($p<0,01$ в обоих случаях по сравнению с фоновым значением). Усиление эмоционального состояния у крыс-самцов было кратковременным, судя по

снижению числа актов дефекации у них с 2,1±0,6 до 1,4±0,5 и с 1,8±0,7 через 1 месяц введения субстанции в дозе 50 и 100 мг/кг соответственно (2 и 3 группы). Изменение суммационно-порогового показателя у подопытных крыс не выходило за пределы сезонной нормы.

При воздействии тиозонида в течение 6 месяцев в периферической крови крыс всех подопытных групп не было существенных отличий от контроля (эритроциты, лейкоциты, гемоглобин, ретикулоциты, лейкоцитарная формула). Тиозонид течение эксперимента не влиял на состояние свёртывания крови подопытных животных всех групп, судя по параметрам коагулограммы.

Введение тиозонида в течение 6 месяцев не оказывало влияния на функцию печени у всех подопытных животных. Содержание глюкозы, концентрация общих липидов, общего холестерина, белка и активность ферментов в сыворотке крови у крыс во всех подопытных группах не отличались от контроля.

Изученные показатели функционального состояния почек (спонтанный диурез за 18 часов, уровень мочевины в сыворотке крови и моче, содержание креатинина в сыворотке крови и моче, нагрузка феноловым красным как показатель секреторной функции почек) не претерпевали существенных изменений под воздействием тиозонида на протяжении всего эксперимента.

После 6 месяцев воздействия исследуемой субстанции не отмечено значимых изменений ЭКГ, однако была выявлена тенденция к увеличению интервала QT у крыс самок в 5 и 6 группе (дозы 10 мг/кг и 100 мг/кг соответственно). Установленные изменения в электрокардиограмме не были дозозависимыми и не выходили за пределы сезонной нормы.

После 6 месяцев внутрижелудочного введения крысам субстанции тиозонида макроскопически не обнаружено местное раздражающее действие на желудочно-кишечный тракт. Однако по результатам гистологических исследований установлено дозозависимое местное раздражающее действие вещества у самцов и самок, наиболее выраженное под влиянием субстанции в дозе 100 мг/кг (табл.).

При забое осмотр животных показал, что все они нормально упитаны, имеют правильное телосложение, опрятны, волосяной покров и естественные отверстия чистые. При макроскопическом исследовании внутренних органов групп контроля и групп с внутрижелудочным введением субстанции тиозонида в дозах 10, 50 и 100 мг/кг во время вскрытия каких-либо особенностей не было выявлено.

При гистологическом исследовании крыс, получавших тиозонид в дозе 10 мг/кг, у отдельных животных отмечены признаки гиперсекреции

Таблица

Типы отличий от фоновых и контрольных показателей у крыс при длительном воздействии субстанции препарата тиозонид

№ группы, пол животных	Доза, мг/кг	Снижение двигательной активности	Увеличение эмоциональной лабильности	Изменение гистологической картины внутренних органов
1, ♂	10	Не выявлено	Не выявлено	Не выявлено
2, ♂	50	Не выявлено	Единично	Единично
3, ♂	100	Стабильно	Единично	Изменение картины ЖКТ
4, ♂	Контроль	Не выявлено	Не выявлено	Не выявлено
5, ♀	10	Не выявлено	Не выявлено	Единично
6, ♀	100	Не выявлено	Не выявлено	Изменение картины ЖКТ
7, ♀	Контроль	Не выявлено	Не выявлено	Не выявлено

слизи и очаговой десквамации эпителия слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта, единично – некроз в тонкой кишке, у 2 самок – изъязвления слизистой оболочки и небольшая макрофагальная реакция в лимфатических узлах. У животных, получавших субстанцию препарата тиозонид в дозе 50 мг/кг, отмечены гиперсекреция слизи, очаговая десквамация эпителия, микроэрозии или язвенные дефекты слизистой оболочки. У крыс, получавших изучаемое вещество в дозе 100 мг/кг, отмечены признаки интоксикации в виде умеренного полнокровия внутренних органов, дистрофических изменений клеток печени, миокарда, половых желёз, чашечно-лоханочной системы почек. В ЖКТ у многих животных отмечены деструктивные изменения слизистой оболочки кишечника в виде эрозий, изъязвлений, некроза апикальных отделов ворсинок слизистой оболочки.

Проведенные исследования токсичности субстанции отечественного препарата тиозонид свидетельствуют о потенциально хорошей его переносимости и отсутствии выраженных поражений жизненно важных систем и органов. Подопыт-

ные животные продемонстрировали отклонения от фоновых показателей только в группах с высокой дозой внутрижелудочного введения изучаемого вещества (значительно выше ТДЧ).

Закключение. По итогам проведенных исследований активная субстанция препарата тиозонид в изученных дозах не вызывала у подопытных кроликов и крыс достоверных изменений интегральных показателей, функции печени, почек, сердечно-сосудистой системы, состава периферической крови и параметров свёртывания крови. Изучаемая субстанция оказывала местное раздражающее действие на ЖКТ, наиболее выраженное под воздействием длительного (6 месяцев) введения в дозе 100 мг/кг, десятикратно превышающей ТДЧ при пересчете с учетом межвидовых различий по Freireich E.J. В этой же дозировке показано снижение двигательной активности у крыс-самцов. По результатам гистологических исследований у крыс были обнаружены незначительные дистрофические изменения в печени, почках и миокарде у части животных под влиянием воздействия фармакологической субстанции тиозонида в дозе 100 мг/кг.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Uplekar M., Weil D., Lonroth K., Jaramillo E., Lienhardt C., Dias H.M. et al. WHO's new end TB strategy. *Lancet*. 2015; 385: 1799 – 1801.
2. Esposito S., D'Ambrosio L., Tadolini M., Schaaf H.S., Caminero Luna J., Marais B. et al. ERS/WHO Tuberculosis Concilium assistance with extensively drug-resistant tuberculosis management in a child: case study of compassionate delamanid use. *European Respiratory Journal*. 2014; 44: 811-815.
3. Marisa K., Robin Mark W., Cindy H., Nicolaas Claudius Gey van P., Elizabeth Maria S., Borna M. et al. Emergence and Spread of Extensively and Totally Drug-Resistant Tuberculosis, South Africa. *Emerging Infectious Disease journal*. 2013; 19: 449.
4. Васильева И.А., Белиловский Е.М., Борисов С.Е., Стерликов С.А. Заболеваемость, смертность и распространенность как показатели бремени туберкулеза в регионах ВОЗ, странах мира и в Российской Федерации. Часть 1. Заболеваемость и распространенность туберкулеза. *Туб. и болезни легких*. 2017; 95 (6): 9-21.
5. Global Tuberculosis Report 2018: WHO/HTM/TB/2018. 20– Geneva: WHO, 2018.
6. Филинок О.В., Фелькер И.Г., Янова Г.В., Буйнова Л.Н., Колоколова О.В. Факторы риска неэффективной химиотерапии больных туберкулезом с множественной лекарственной устойчивостью. *Туб. и болезни легких*. 2014; (1): 20-26
7. Щегерцов Д.Ю., Филинок О.В., Буйнова Л.Н., Земляная Н.А., Кабанец Н.Н., Аллилуев А.С. Нежелательные побочные реакции при лечении больных туберкулезом с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя. *Туб. и болезни легких*. 2018; 96 (3): 35-43.
8. Меньшикова Л.А. Фармакокинетическое исследование оригинального лекарственного средства тиозонида: Автореф. дис. канд. фарм. наук: М., 2016.
9. Бочарова И.В., Буренков М.С., Лелеха Л.Н., Смирнова Т.Г., Черноусова Л.Н., Демикова О.В. Доклинические исследования специфической активности нового противотуберкулезного препарата тиозонид. *Туб. и болезни легких*. 2014; (6): 46-50. doi.org/10.21292/2075-1230-2014-0-6-46-50.

10. Freireich E., Karon M., Frei E.

Quadruple combination therapy (VAMP) for acute lymphocytic leukemia of childhood. Proc. Am. Ass. Cancer Res. 1964; 5: 20.

REFERENCES:

1. Uplekar M., Weil D., Lonnroth K., Jaramillo E., Lienhardt C., Dias H.M., ... & Gilpin C. WHO's new end TB strategy. Lancet, 2015, vol. 385. pp. 1799 – 1801.

2. Esposito S, D'Ambrosio L, Tadolini M, Schaaf HS, Caminero Luna J, Marais B, Centis R, Dara M, Matteelli A, Blasi F, Migliori GB. ERS/WHO Tuberculosis Consilium assistance with extensively drug-resistant tuberculosis management in a child: case study of compassionate delamanid use. European Respiratory Journal. 2014; 44: pp. 811-815

3. Marisa K, Robin Mark W, Cindy H, Nicolaas Claudius Gey van P, Elizabeth Maria S, Borna M, Frederick Adriaan S, Mamisa CN, Ebrahim H, Gerrit C, Paul David van H, Thomas Calldo V, André

11. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая.-М.:Гриф и К, 2012. - 944 с.

Phillip T. Emergence and Spread of Extensively and Totally Drug-Resistant Tuberculosis, South Africa. Emerging Infectious Disease journal. 2013; 19: 449.

4. Vasil'eva I.A., Belilovskij E.M., Borisov S.E., Sterlikov S.A. Morbidity, mortality and prevalence as indicators of the burden of tuberculosis in WHO regions, countries of the world and in the Russian Federation. Part 1. Tuberculosis incidence and prevalence. Tuberculosis and lung disease. 2017; 95 (6): 9-21 (in Russian).

5. Global Tuberculosis Report 2018: WHO/HTM/TB/2018.20- Geneva: WHO, 2018.

6. Filinyuk O.V., Fel'ker I.G., Yanova G.V., Bujnova L.N., Kolokolova O.V. Risk factors for ineffective chemotherapy for

12. Боровиков, В.П., Боровиков И.П. Статистический анализ и обработка данных в среде Windows. В.П.- М.: Филинь; 1997.

multidrug-resistant tuberculosis patients. Tuberculosis and lung disease. 2014, 1, 20-26 (in Russian).

7. Shchegertsov D.Yu., Filinyuk O.V., Bujnova L.N., Zemlyanaya N.A., Kabanec N.N., Alliluev A.S. Undesirable adverse reactions in the treatment of patients with multidrug-resistant tuberculosis of the pathogen. Tuberculosis and lung disease. 2018;96 (3): 35-43 (in Russian).

8. Men'shikova L.A. Pharmacokinetic study of the original drug thioisonide: Kand. pharm. sci. diss., Moscow, 2016 (in Russian).

9. Bocharova I.V., Burenkov M.S., Lepekha L.N., Smirnova T.G., Hermousova L.N., Demihova O.V. Preclinical studies of the specific activity of the new anti-TB drug

13. Harris M., Taylor G. Medical statistics made easy. London: Taylor and Francis; 2006.

thioisonide. Tuberculosis and lung disease. 2014; (6): 46-50 (in Russian).

10. Freireich E., Karon M., Frei E. Quadruple combination therapy (VAMP) for acute lymphocytic leukemia of childhood. Proc. Am. Ass. Cancer Res. - 1964. - Vol.5. - P.20.

11. Guidelines for preclinical studies of drugs. Part one. - M.: Grif and K, 2012, 944 p (in Russian).

12. Borovikov V.P. Borovikov I.P. Statistical analysis and data processing in Windows - M.: Filin, 1997, 608 p. (in Russian).

13. Harris M. Medical statistics made easy / M. Harris, G. Taylor. - London: Taylor and Francis, 2006.

A.Yu. Savchenko², M.S. Burenkov³, P.S. Baidin³, G.V. Ramenskaya¹, V.G. Kukes⁴

STUDY OF THE GENERAL TOXIC PROPERTIES OF THE ANTI-TB DRUG THIOISONIDE

¹I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, 119991, Moscow, Russian Federation

²Scientific Center of Biomedical Technology of the Federal Medical and Biological Agency, 143442, Svetlye Gory Village, Krasnogorsk District, Moscow region, Russian Federation

³Joint-Stock Company «Pharm-Sintez», 111024, Moscow, Russian Federation

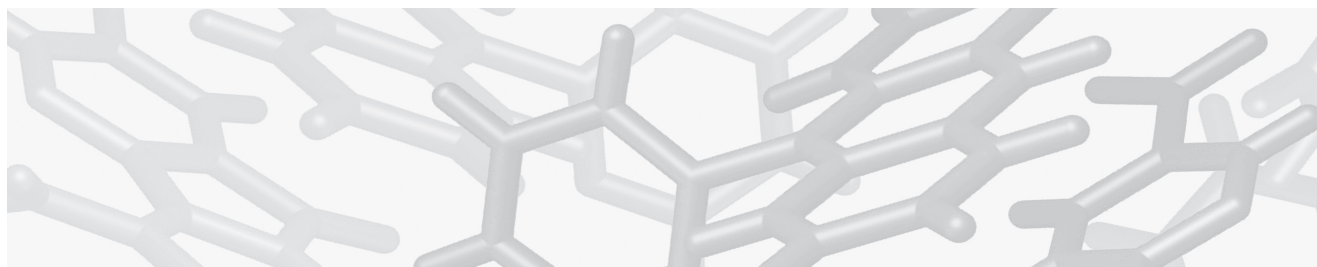
⁴Clinical Pharmacology Branch of the Scientific Center of Biomedical Technology of the Federal Medical and Biological Agency, 109240, Moscow, Russian Federation

The aim of the study was to evaluate the subchronic and chronic toxicity of the substance – thioisonide - in experiments on rabbits and rats. The animals received doses ranging from therapeutic to 75 times higher. The drug in studied doses did not cause any significant changes in body weight increase of animals, behavioral reactions, food and water consumption. There were no changes in the biochemical and cellular composition of peripheral blood, the protein-synthesizing function of the liver, carbohydrate metabolism, and the functional state of the cardiovascular system. In the work of the central nervous system, a slight decrease in motor activity was observed in male rats that were long-term treated with a drug substance in a dose of 100 mg/kg (more than 10 times higher than the therapeutic dose). A local irritant effect in the gastrointestinal tract of experimental rats was noted according to the results of histological studies, most pronounced under the influence of the drug at a dose of 100 mg/kg. According to the results of histological studies, minor dystrophic changes in the liver, kidneys and myocardium were found in some animals under the influence of a drug substance at a dose of 100 mg/kg. Thus, the active substance of the anti-tuberculosis drug does not have toxic properties that limit its long-term use, which allows us to consider it as a promising tool for inclusion in the basic long-term courses of treatment of the disease.

Keywords: thioisonide, subchronic and chronic toxicity, rabbits, rats.

Quote: A.Y. Savchenko, M.S. Burenkov, P.S. Baidin, G.V. Ramenskaya, V.G. Kukes. Study of the general toxic properties of the anti-tb drug thioisonide. Toxicological Review. 2021; 1:47-51.

Материал поступил в редакцию 25.11.2020 г.



ОЦЕНКА ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ НОВОГО ПРОИЗВОДНОГО БЕНЗИМИДАЗОЛА С АНТИТРОМБОГЕННЫМИ СВОЙСТВАМИ

А.А. Спасов^{1,2}, А.Ф. Кучерявенко¹,
Д.В. Мальцев^{1,2}, М.В. Мирошников¹,
В.С. Сиротенко¹, К.Т. Султанова¹,
К.А. Гайдукова¹, М.О. Скрипка¹

¹Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 400131, г. Волгоград, Российская Федерация

²Государственное бюджетное учреждение Волгоградский медицинский научный центр 400131, г. Волгоград, Российская Федерация

В настоящем исследовании представлены результаты изучения токсикологического профиля новой фармацевтической субстанции (ФС) РУ-891 с антитромбогенными свойствами. Были определены границы минимальной токсической дозы ($ТД_{мин}$) для ФС РУ-891 при пероральном введении: $230 \text{ мг/кг} < ТД_{мин} \leq 460 \text{ мг/кг}$. В опытах по изучению острой токсичности соединения РУ-891 были установлены характер и выраженность его повреждающего действия на организм экспериментальных животных и произведена оценка безопасности его действия. При изучении токсического действия тестируемого образца определены переносимые и токсические дозы ФС РУ-891, выявлены наиболее чувствительные к изучаемому препарату органы и системы организма.

Ключевые слова: фармацевтическая субстанция РУ-891, острая токсичность, антитромбогенные свойства.

Цит: А.А. Спасов, А.Ф. Кучерявенко, Д.В. Мальцев, М.В. Мирошников, В.С. Сиротенко, К.Т. Султанова, К.А. Гайдукова, М.О. Скрипка. Оценка острой токсичности нового производного бензимидазола с антитромбогенными свойствами. Токсикологический вестник. 2021; 1:52-57.

Введение. Ключевая роль в патогенезе ишемической болезни сердца, инсульта, осложненный сахарного диабета и других нарушений кровоснабжения органов и тканей отводится тромбообразованию [1]. С целью снижения риска развития и осложнений таких патологий используют различные методы и препараты, уменьшающие повышенную функциональную активность тромбоцитов, так как именно агрегация последних выполняет первостепенную роль в начальных, пусковых механизмах свертывания крови [2,3]. Таким образом, антитром-

боцитарная терапия способна уменьшать риск развития тромбозов и предотвращать острую коронарную смерть. К сожалению, современные антиагрегантные средства не всегда удовлетворяют предъявляемым к ним требованиям, в виду наличия побочных эффектов в виде кровотечений, гастропатий и др.

Химический класс замещенных гетероциклических азотосодержащих соединений считается перспективным для создания на его основе новых препаратов, о чем свидетельствует широкий спектр проявляемой биологической активности

Спасов Александр Алексеевич (Spasov Aleksandr Alekseyevich), доктор медицинских наук, профессор, Академик РАН, Заслуженный деятель науки РФ, заведующий кафедрой фармакологии и биоинформатики ВолгГМУ, aspasov@mail.ru;

Кучерявенко Аида Фатиховна (Kucheryavenko Aida Fatikhovna), доктор медицинских наук, доцент, профессор кафедры фармакологии и биоинформатики ВолгГМУ, aidakucheryavenko@yandex.ru;

Мальцев Дмитрий Васильевич (Maltsev Dmitriy Vasil'yevich), кандидат биологических наук, доцент кафедры фармакологии и биоинформатики ВолгГМУ, научный сотрудник ГБУ ВМНЦ, maltsevdmitriy@rambler.ru;

Мирошников Михаил Владимирович (Miroshnikov Mikhail Vladimirovich), кандидат медицинских наук, ассистент кафедры фармакологии и биоинформатики ВолгГМУ, mihailmiroshnikov@mail.ru;

Сиротенко Виктор Сергеевич (Sirotenko Viktor Sergeevich), кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармакологии и биоинформатики ВолгГМУ, sirotenko.viktor@yandex.ru;

Султанова Кира Тимуровна (Sultanova Kira Timurovna), ассистент кафедры фармакологии и биоинформатики ВолгГМУ, sultanova.pharma@gmail.com;

Гайдукова Ксения Андреевна (Gaidukova Ksenia Andreevna), кандидат медицинских наук, ассистент кафедры фармакологии и биоинформатики ВолгГМУ, ksenijagajdukva@rambler.ru;

Скрипка Мария Олеговна (Skripka Maria Olegovna), аспирант кафедры фармакологии и биоинформатики ВолгГМУ, rete.mirabile.renis@gmail.com

[4,5,6,7,8]. В ранее проведенных исследованиях, установлена способность нового производного бензимидазола -соединения РУ-891 снижать тромбогенный потенциал крови [9,10]. Данные результаты позволяют сделать заключение о высокой эффективности нового производного бензимидазола и о необходимости дальнейшего углубленного изучения спектра его активности, а также возможных токсических эффектов [11,12]. При детальном изучении механизма антиагрегантного действия данного соединения было показано в разной степени выраженное влияние на пуриновые рецепторы тромбоцитов, рецепторы к коллагену, адреналину, тромбину, тромбоксану A_2 и др. Действие соединения РУ-891 на различные рецепторы тромбоцитов обуславливает высокую вероятность вовлеченности центральной нервной системы, а именно влияние на регуляцию физиологических и поведенческих процессов, что влечет за собой необходимость изучения функционально-поведенческого статуса животных, нейросоматического и психотропного эффектов. Поэтому в рамках дальнейшего изучения и определения широты терапевтического диапазона соединения РУ-891. Используемая модификация метода S. Irwin [5] позволяет изучить влияние фармацевтической субстанции на общеклиническое состояние животных, в то же время и оценить ее нейротоксический потенциал в диапазоне от среднеэффективной (ED_{50}) до сублетальной (LD_{50}) дозы.

Цель работы - изучить острую токсичность соединения РУ-891 на двух видах животных и определить переносимые, токсические и летальную дозы, с целью выявления причин наступления гибели животных с анализом клинической картины интоксикации.

Материалы и методы исследования. Изучение острой токсичности соединения РУ-891 проводили на половозрелых мышах, массой от 18 до 22 г и крысах, массой 200-220 г обоего пола, в количестве 168 и 120 особей соответственно. Все процедуры с животными в исследовании проведены в соответствии с общепринятыми этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (1986) и с учетом Международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях (1997), а также требований Директивы 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза от 22.09.2010 г по охране животных, используемых в научных целях.

Экспериментальное исследование одобрено Региональным Исследовательским Этическим Комитетом Волгоградской области (регистра-

ционный номер IRB 00005839 IORG 0004900 (OHRP)) протокол №2032-2017 от 26.06.2017г.

При изучении острой токсичности тестируемый образец РУ-891 растворяли в дистиллированной воде и вводили мышам и крысам перорально (атравматичным металлическим зондом) в дозах – 250; 500; 1000; 1500; 3000; 5000 мг/кг. Контрольной группе животных вводился растворитель (вода дистиллированная). Объем вводимых образцов был рассчитан индивидуально для каждой особи, исходя из массы ее тела – 0,1 мл на 100 г живого веса.

После введения соединения РУ-891 за животными было установлено наблюдение для регистрации смертности и токсических признаков в течение 14 дней исследования: в первые сутки в течение 6 часов после введения вещества регистрировали сроки развития интоксикации и гибель животных, в последующие дни - 2 раза в день (утром и вечером). Фиксировали общее состояние животных - состояние шерстного покрова; слизистых оболочек; подвижность, реакцию на тактильные, болевые, звуковые раздражители, потребление корма, воды, изменение массы тела характеризующие токсическое действие; производили оценку негативного влияния на неврологический статус: наличие тремора, судорожного синдрома, изменение подвижности, двигательной активности, стереотипного поведения и седации. На 15 день все животные были подвержены эвтаназии. После гибели животных в результате токсического действия соединения РУ-891 или после эвтаназии проводилось вскрытие животного, с последующим макроскопическим изучением места введения препарата и внутренних органов.

Статистическая обработка полученных данных производилась с применением критерия Краскелла-Уоллиса и посттестом Даннета в программе GraphPad Prism v.5.0. По результатам гибели животных рассчитана величина LD_{50} , исследуемого соединения РУ-891 по методу Литчфилда и Уилкоксона, с использованием регрессионной статистики (Microsoft Excel).

Результаты и обсуждение. При изучении острой токсичности на мышах были созданы опытные и контрольная группы животных. Контрольная группа мышей служила группой сравнения с мышами опытных групп по общему состоянию и спонтанной подвижности в период 2-х недельных наблюдений. В группе мышей, получавших соединение РУ-891 в дозе 250 мг/кг, в отличие от группы контрольных животных, отмечали тенденцию снижения реакции на болевые и тактильные раздражители в течение 3-х часов после введения вещества у самцов и в течение 1 часа у самок. Через 5-6 часов состояние мышей восстанавливалось и в последующие дни наблю-

дения общее состояние и поведение мышей не отличалось от контрольной группы (табл. 1).

В опытных группах мышей, получавших соединение РУ-891 в дозе 500 мг/кг, состояние мышей характеризовалось настороженностью, пугливостью. Через 1 час после введения вещества отмечали снижение реакции на болевые и тактильные раздражители, снижение спонтанной подвижности, седацию. Через 24 часа общее состояние мышей восстанавливалось и не отличалось от контрольной группы (табл. 1). Отдаленную гибель отмечали у одной мыши-самки на 9 сутки после введения вещества.

В группе мышей-самцов, получавших соединение РУ-891 в дозе 1000 мг/кг отмечали снижение реакции на болевые и тактильные раздражители, спонтанной подвижности, седацию. Гибель 2-х самок отмечена через 2 дня после введения тестируемого образца. В последующие дни состояние выживших мышей не отличалось от контрольной группы, однако на 6 сутки отмечена гибель 1 самца. При увеличении дозы тестируемого образца РУ-891 до 1500 мг/кг у самцов и самок выявляли снижение спонтанной подвижности, признаки седации и уменьшение реакции на болевые и тактильные раздражители в течение 2-4 часов после введения. Отмечена гибель 3 особей в опытных группах самцов и самок через 4 часа после введения соединения РУ-891.

В последующие дни наблюдения общее состояние выживших мышей не отличалось от контрольной группы, отсроченной гибели не выявлено (табл. 1). При введении соединения РУ-891 в дозе 3000 мг/кг у самцов и самок отмечали более длительное снижение спонтанной подвижности, признаки седации, уменьшение реакции

на болевые и тактильные раздражители, увеличение частоты дыхания. Наблюдалась гибель 4 особей в опытных группах самцов и самок через 4 часа после введения вещества. В последующие дни наблюдения у выживших животных общее состояние не отличалось от контрольной группы, отсроченной гибели не выявлено (табл. 1). При введении соединения РУ-891 в дозе 5000 мг/кг у самцов и самок отмечали аналогичные признаки интоксикации, состояние усугублялось, токсическое действие было более длительным. Отмечалась 100% гибель мышей в группах самцов и самок в период от 1 до 5 часов после внутрижелудочного введения соединения РУ-891 (табл.1)

При некропии группы мышей, получавших соединение РУ-891 в дозах 250-500 мг/кг не наблюдалось видимых морфологических изменений на поверхности внутренних органов и их анатомического рисунка. У мышей-самок, погибших после 1-х суток после введения соединения РУ-891, ткань легкого неравномерной плотности с участками бледно-розового цвета и точечными кровоизлияниями по всей поверхности.

У мышей, погибших в 1 сутки, получавших соединение РУ-891 в дозе 1000 мг/кг, выявлены петехиальные кровоизлияния по всей поверхности ткани легкого, повышенное кровенаполнение сосудов головного мозга, обесцвечивание печени до светло-коричневого цвета. У мышей, погибших на 9 сутки после введения соединения РУ-891, ткань легкого неравномерной плотности с участками бледно-розового цвета и точечными кровоизлияниями по всей поверхности. В группах мышей получавших соединение РУ-891 в дозах 1500 – 3000 мг/кг погибших в течение первых

Таблица 1

Динамика гибели мышей при внутрижелудочном введении соединения РУ-891*

N п/п	Испытуемые дозы препарата	Количество погибших особей (%) от общего количества мышей в группе			
		Самцы		Самки	
		1 сутки	14 сутки	1 сутки	14 сутки
1	250 мг/кг	0	0	0	0
2	500 мг/кг	0	0	0	16,6
3	1000 мг/кг	0	16,6	33,3	33,3
4	1500 мг/кг	50	50	50	50
5	3000 мг/кг	66,6	66,6	66,6	66,6
6	5000 мг/кг	100	100	100	100

*Примечание: группы контрольных животных в таблицу не внесены.

суток отмечали изменение цвета легких до бледно-розового цвета с точечными кровоизлияниями (петехиями) по всей поверхности ткани легкого. При макроскопическом исследовании мышей на 15 сутки эксперимента выявлены точечные кровоизлияния по всей поверхности ткани легкого и обесцвечивание печени до светло-коричневого цвета. В пищеводе и желудке складчатость слизистой оболочки сохранена, признаков раздражения или отека на слизистой желудка не зарегистрировано, кашицеобразное содержимое желудка, свидетельствует об обычном потреблении корма и воды аналогично мышам контрольной группы. В группах мышей, получавших тестируемый образец РУ-891 в дозе 5000 мг/кг и погибших в течение первых суток, наблюдали повышенное кровенаполнение сосудов головного мозга, ткань легкого неравномерной плотности от светло-розового до темно-розового цвета у разных особей, с многочисленными точечными кровоизлияниями. Отмечено обесцвечивание печени до светло-коричневого цвета у всех мышей.

По результатам гибели мышей рассчитаны величины LD_{50} исследуемого соединения РУ-891 по методу Литчфилда и Уилкоксона. Величина острой токсичности соединения РУ-891 через 14 суток после однократного внутрижелудочного введения мышам с указанием стандартной ошибки представлена в таблице 2.

В группах опытных крыс, получавших соединения РУ-891 в дозах 250-1000 мг/кг, в течение 3-х часов после введения тестируемого образца наблюдали снижение двигательной активности и незначительное снижение реакции на болевые, тактильные и слуховые раздражители. В последующие дни наблюдения общее состояние и поведение крыс не отличалось от контрольной группы. Гибели в первые сутки и в последующие дни наблюдения не выявлено. В группе опытных крыс, получавших соединения РУ-891 в дозе 1500 мг/кг у самцов и самок через 30 минут после введения исследуемого со-

единения наблюдали повышение частоты дыхания, незначительное снижение реакции на болевые, тактильные и слуховые раздражители. В течение 2-х часов у самок и в течение 3-х часов у самцов снижение двигательной активности. В последующие дни наблюдения общее состояние и поведение крыс не отличалось от контрольной группы. Гибели в первые сутки и в последующие дни наблюдения не выявлено. В группе опытных крыс, которым соединение РУ-891 вводилось в дозе 2000 мг/кг отмечали повышение частоты дыхания и снижение реакций на болевые и тактильные раздражители в течение 2 часов после введения, в течение 4 часов отсутствие локомоций. Гибели в первые сутки и в последующие дни наблюдения не выявлено. При увеличении вводимой дозы соединения РУ-891 до 5000 мг/кг отмечали признаки седации, отсутствие локомоций, увеличение частоты дыхания, снижение реакций на болевые, тактильные и слуховые раздражители. У самцов признаки токсического действия соединения РУ-891 были более выражены. В 1 сутки через 5-6 часов после введения соединения РУ-891 отмечена гибель 2 самцов. В группе самок гибели в 1 сутки эксперимента не зафиксировано. В последующие дни наблюдения общее состояние и поведение крыс не отличалось от контрольной группы, отдаленной гибели в группе самцов не выявлено, в группе крыс самок зафиксирована гибель 1 самки на 4 сутки эксперимента (табл. 3).

После эвтаназии на 15 сутки эксперимента производилось патоморфологическое исследование внутренних органов крыс. На 15 сутки после введения соединения РУ-891 в дозах 250-1500 мг/кг не наблюдалось видимых морфологических изменений на поверхности внутренних органов и их анатомического рисунка. У крыс, получавших соединения РУ-891 в дозе 2000 мг/кг, головной мозг содержит темно-красный экссудат, кровенаполнение сосудов головного мозга обычное. В легких патологические образования отсутству-

Таблица 2

Показатели острой токсичности соединения РУ-891 через 14 суток после однократного внутрижелудочного введения мышам

Пол животных	LD_{50} (мг/кг)
Мыши самцы	1749,14 2117,88±1444,61
Мыши самки	1407,71 1762,92±1124,06

Статистическая обработка данных проводилась по методу Литчфилда и Уилкоксона

Таблица 3

Результаты гибели крыс после введения соединения РУ-891 внутрижелудочно*

N п/п	Испытуемые дозы препарата, мг/кг	Количество погибших особей (%) от общего количества крыс в группе			
		Самцы		Самки	
		1 сутки	14 суток	1 сутки	14 суток
1	250	0	0	0	0
2	500	0	0	0	0
3	1000	0	0	0	0
4	1500	0	0	0	0
5	3000	0	0	0	0
6	5000	40	40	0	20

*Примечание: группы контрольных животных в таблицу не внесены.

Таблица 4

Показатели острой токсичности соединения РУ-891 через 14 суток после однократного внутрижелудочного введения крысам

Исследуемые группы	Величина ЛД ₅₀ Соединение РУ-891, мг/кг
Крысы-самцы	> 5000
Крысы-самки	> 5000

ют, ткань легкого равномерной плотности у разных особей от розового до красно-серого цвета. Печень обесцвечена до светло-коричневого цвета, на периферии более светлая. В группах крыс, получавших соединение РУ-891 в дозе 5000 мг/кг, головной мозг содержит темно-красный экссудат, кровенаполнение сосудов головного мозга обычное. Легкие без патологических образований, равномерной плотности, бледно-розового цвета, с мелкоточечными кровоизлияниями. Не наблюдалось изменений со стороны ЖКТ и мочевыделительной системы. Таким образом, при наблюдении за крысами опытных групп, получавших соединение РУ-891 внутрижелудочно в токсических дозах от 1000, 2000 и 5000 мг/кг, выявлена характерная патоморфология интоксикации: появление темно-красного экссудата в головном мозге, легкие неравномерно окраше-

ны (от светло-розового до красно-серого цвета) с точечными кровоизлияниями, печень обесцвечена, у части особей на периферии светлее. Величина ЛД₅₀ исследуемого соединения РУ-891 по методу Литчфилда и Уилкоксона не была рассчитана, ввиду невозможности нахождения точки 100%-ной гибели особей (табл. 4), что позволяет отнести субстанцию к малоопасным (4 класс опасности) веществам в соответствии с ГОСТ 12.2.007-76.

Закключение. Согласно результатам исследований острой токсичности соединения РУ-891 на мышцах при внутрижелудочном введении ЛД₅₀ с учетом классификации токсичности по И.В. Березовской (2003) [1] и в соответствии с ГОСТ 12.1.007-76, данное вещество, может быть отнесено к 3 классу токсичности, что соответствует умеренно токсичным веществам.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Anisimova V.A., Spasov A.A., Ostrovskii O.V., Dudchenko G.P., Kosolapov V.A., Kucheryavenko A.F. et al. Synthesis and pharmacological activity of 3-aryl- and 3-hetarylimidazo[1,2-a]benzimidazoles. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. - 2002. - Vol.36. - No. 12. - pp. 637-642.
2. Anisimova V.A., Kucheryavenko A.F., Spasov A.A. et al. Synthesis and biological activity of n-acylmethyl derivatives of 9h-2,3-dihydroimidazo- and 10h-2,3,4,10-tetrahydropyrimido[1,2-a]benzimidazoles and their reduction products. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. - 2006. - Vol.40. - No. 5. - pp. 261-267.
3. Mozaffarian D., Benjamin E.J., Go A.S., Arnett D.K., Blaha M.J. et al. Heart disease and stroke statistics (a report from the American Heart Association). *Circulation*. - 2016. - No. 133. - pp. 38-60.
4. Spasov A.A., Nedogoda V.V., Konan K., Kucheryavenko A.F. Mechanism of reduction of platelet sensitivity to medicines in response to low-energy laser radiation of blood. *Hematology and Transfusiology*. - 2001. - Vol.46. - No. 2. - pp. 36-39.
5. Бугаева Л.И., Кузубова Е.А., Букатин М.В., Спасов А.А. Нейротоксикологические свойства препарата «Бендазол». *Вестник ВолгГМУ*. - 2012. - №2. - с. 83-86.
6. Голухова Е.З., Рябинина М.Н. Современные аспекты антиагрегантной терапии. *Креативная кардиология*. - 2013. - №1. - с. 46-58.
7. Кучерявенко А.Ф., Анисимова В.А., Гайдукова К.А., Диваева Л.Н., Спасов А.А. и др. Антиагрегантная активность нового трициклического производного

2,3,4,5-тетрагидро[1,3]дiazеино[1,2-а] бензимидазола. Экспериментальная и клиническая фармакология. - 2016. - Т.79. - №5. - с. 29-32.
8. Кучерявенко А.Ф., Спасов А.А., Петров В.И. и др. Антиагрегантная активность нового производного бензимидазола. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2013. - Т.156. - №12. - с. 760-762.
9. Мирошников М.В. и др. Анксиолитиче-

ский потенциал нового ряда производных diaзепинобензимидазола. Вестник ВолгГМУ. - 2018. - Т.67. - №3. - с. 19.
10. Спасов А.А., Кучерявенко А.Ф., Косолапов В.А., Анисимова В.А. Анти-тромбогенная активность антиоксидантных соединений. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2013. - Т.155. - № 6 - с. 740-742.
11. Спасов А.А., Дудченко Г.П., Гаврилова Е.С., Кучерявенко А.Ф. и др. Диабенол -

новое противодиабетическое вещество с гемобиологическими свойствами. Вестник Волгоградской медицинской академии. - 1997. - Т.52. - № 3. - с. 47-51.
12. Спасов А.А., Кучерявенко А.Ф., Анисимова В.А. Кальций-зависимый механизм антиагрегантного действия соединения РУ-891. Экспериментальная и клиническая фармакология. - 2014. - Т. 77. - №. 3. - с. 16-19.

13. Спасов А.А., Смирнов А.В., Кучерявенко А.Ф. Антитромботическая активность нового производного бензимидазола на модели тромбоза у мышей. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2014. - Т.157. - №. 5. - с. 595-598.
14. Спасов А.А. и др. Антитромботическая активность соединения РУ-891. Экспериментальная и клиническая фармакология. - 2013. - Т.76. - №. 6. - с. 25-26.

REFERENCES:

1. Anisimova V.A., Spasov A.A., Ostrovskii O.V., Dudchenko G.P., Kosolapov V.A., Kucheryavenko A.F. et al. Synthesis and pharmacological activity of 3-aryl- and 3-heteroarylimidazo[1,2-a] benzimidazoles. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. - 2002. - Vol. 36. - No. 12. - pp. 637-642.
2. Anisimova V.A., Kucheryavenko A.F., Spasov A.A. et al. Synthesis and biological activity of n-acylmethyl derivatives of 9h-2,3-dihydroimidazo- and 10h-2,3,4,10-tetrahydropyrimido[1,2-a] benzimidazoles and their reduction products. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. - 2006. - Vol. 40. - No. 5. - pp. 261-267.
3. Mozaffarian D., Benjamin E.J., Go A.S., Arnett D.K., Blaha M.J. et al. Heart disease and stroke statistics (a report from the American Heart Association). *Circulation*. - 2016. - No. 133. - pp. 38-60.

4. Spasov A.A., Nedogoda V.V., Konan K., Kucheryavenko A.F. Mechanism of reduction of platelet sensitivity to medicines in response to low-energy laser radiation of blood. *Hematology and Transfusiology*. - 2001. - Vol.46. - No. 2. - pp. 36-39 (in Russian).
5. Bugaeva L.L., Kuzubova E.A., Bukatin M.V., Spasov A.A. Neurotoxicological properties of the drug «Bendazol». *Vestnik VolgSMU*. - 2012. - No. 2. - pp. 83-86 (in Russian).
6. Golukhova E.Z., Ryabinina M.N. Modern aspects of antiplatelet therapy. *Creative Cardiology*. - 2013. - No. 1. - pp. 46-58 (in Russian).
7. Kucheryavenko A.F., Anisimova V.A., Gaidukova K.A., Divaeva L.N., Spasov A.A. et al. Antiplatelet activity of a new bicyclic derivative of 2,3,4,5-tetrahydro[1,3]diazepino[1,2-a] benzimidazole. *Experimental and Clinical*

Pharmacology. - 2016. - Vol. 79. - No. 5. - pp. 29-32 (in Russian).
8. Kucheryavenko A.F., Spasov A.A., Petrov V.I. et al. Antiplatelet activity of a new benzimidazole derivative. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. - 2013. - Vol. 156. - No. 12. - pp. 760-762 (in Russian).
9. Miroshnikov M.V. et al. The anxiolytic potential of a new series of diazепинобензимидазоле derivatives. *Vestnik VolgSMU*. - 2018. - Vol. 67. - No. 3. - p. 19 (in Russian).
10. Spasov A.A., Kucheryavenko A.F., Kosolapov V.A., Anisimova V.A. Antithrombotic activity of antioxidant compounds. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. - 2013. - Vol. 155. - No. 6. - pp. 740-742 (in Russian).
11. Spasov A.A., Dudchenko G.P., Gavrilova E.S., Kucheryavenko A.F. et al. Diabenol - new antidiabetic substance

with geobiological properties. *Bulletin of the Volgograd Medical Academy*. - 1997. - Vol. 52. - No. 3. - pp. 47-51 (in Russian).
12. Spasov A.A., Kucheryavenko A.F., Anisimova V.A. Calcium-dependent mechanism of antiplatelet action of compound RU-891. *Experimental and Clinical Pharmacology*. - 2014. - Vol. 77. - No. 3. - pp. 16-19 (in Russian).
13. Spasov A.A., Sмирнов А.В., Кучерявенко А.Ф. Antithrombotic activity of a new benzimidazole derivative on a model of thrombosis in mice. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. - 2014. - Vol. 157. - No. 5. - pp. 595-598 (in Russian).
14. Spasov A.A. et al. Antithrombotic activity of the compound RU-891. *Experimental and Clinical Pharmacology*. - 2013. - Vol. 76. - No. 6. - pp. 25-26 (in Russian).

A.A. Spasov^{1,2}, A.F. Kucheryavenko¹, D.V. Maltsev^{1,2}, M.V. Miroshnikov¹, V.S. Sirotenko¹, K.T. Sultanova¹, K.A. Gaidukova¹, M.O. Skripka¹

ACUTE TOXICITY OF A NEW BENZIMIDAZOLE DERIVATIVE WITH ANTITHROMBOGENIC PROPERTIES

¹Volgograd State Medical University, Department of Pharmacology and Bioinformatics, RF Ministry of Health, 400131, Russia, Volgograd, Russian Federation

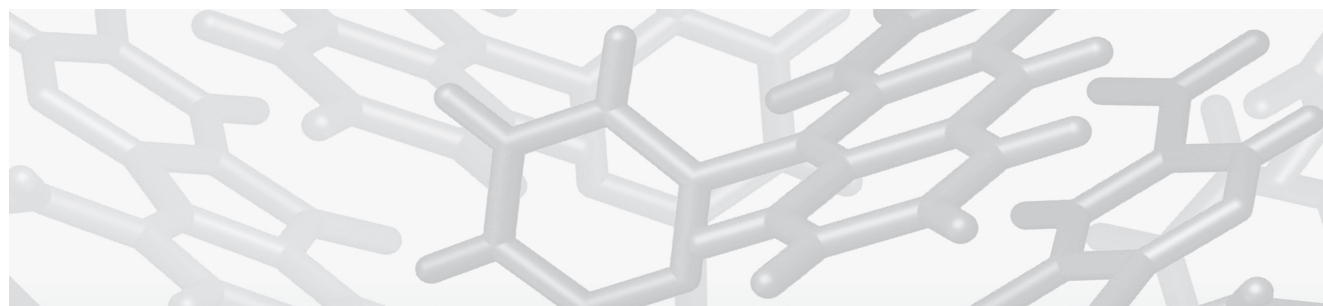
²Volgograd Medical Research Center, Laboratory of Experimental Pharmacology, 400131, Volgograd, Russian Federation

The paper presents the results of studying the toxicological profile of a new pharmaceutical substance RU-891 with antithrombotic properties. The minimum toxic dose (TD_{min}) for RU-891 by peroral administration is $230 \text{ mg/kg} < TD_{min} \leq 460 \text{ mg/kg}$. In experiments on the acute toxicity of the compound RU-891, the nature and severity of its damaging effect on the body of experimental animals were established and the safety of its action was evaluated. When studying the toxic effect of the test sample, the tolerated and toxic doses of RU-891 were determined, and the most sensitive organs and systems of the body were identified.

Keywords: pharmaceutical substance RU-891, acute toxicity, antithrombotic properties.

Quote: A.A. Spasov, A.F. Kucheryavenko, D.V. Maltsev, M.V. Miroshnikov, V.S. Sirotenko, K.T. Sultanova, K.A. Gaidukova, M.O. Skripka. Acute toxicity of a new benzimidazole derivative with antithrombotic properties. *Toxicological Review*. 2021; 1:52-57.

Материал поступил в редакцию 28.05.2020 г.



ХИМИЧЕСКАЯ БЕЗОПАСНОСТЬ

УДК 615.91:632.15

DOI: 10.36946/0869-7922-2021-1-58-62.

РЕШЕНИЕ ВОПРОСОВ РЕГУЛИРОВАНИЯ ОТХОДОВ, СОДЕРЖАЩИХ СТОЙКИЕ ОРГАНИЧЕСКИЕ ЗАГРЯЗНИТЕЛИ, В РЕСПУБЛИКЕ КАЗАХСТАН

Н.М. Анисимова¹,
В.В. Мустафина¹, Н.В. Гор²

¹ОФ «Центр «Содействие устойчивому развитию», 050022, г. Алматы, Республика Казахстан
²Программа развития Организации Объединенных Наций в Казахстане / Представительство ООН в г. Нур-Султан, 010000, г. Нур-Султан, Республики Казахстан

Вданной статье приводится анализ законодательной базы Республики Казахстан по регулированию обращения с СОЗ-содержащими отходами, рассмотрен опыт регулирования СОЗ-пестицидов, СОЗ-содержащего оборудования и отходов, утилизации и уничтожения ПХД-отходов, обзор плана выполнения обязательств Стокгольмской конвенции о СОЗ.

Ключевые слова: стойкие органические загрязнители (СОЗ), отходы, СОЗ-содержащие отходы, обращение с отходами, Республика Казахстан, полихлорированные дифенилы (ПХД).

Цит: Н.М. Анисимова, В.В. Мустафина, Н.В. Гор. Решение вопросов регулирования отходов, содержащих стойкие органические загрязнители, в Республике Казахстан. Токсикологический вестник. 2021; 1:58-62.

Стойкие органические загрязнители (СОЗ) представляют собой группу токсических химических веществ, которые характеризуются биоаккумуляцией и являются устойчивыми к разложению. Они легко переносятся по воздуху, воде на большие расстояния, накапливаются в наземных и водных экосистемах. Даже малые дозы СОЗ представляют угрозу здоровью человека, животным, окружающей среде.

В Казахстане нет производства СОЗ, однако накопилось большое количество отходов, содержащих СОЗ, поэтому проблемы их утилизации актуальны для страны, требуют решения, тем более, что республика обязалась выполнять требования международных конвенций по химической безопасности и прежде всего Стокгольмской конвенции о стойких органических загрязнителях.

Казахстан подписал Стокгольмскую конвенцию о стойких органических загрязнителях в 2001 году и ратифицировал ее в 2007 году [1]. В декабре 2009 года был принят Национальный план выполнения обязательств Республики Казахстан по Стокгольмской конвенции о стойких органических загрязнителях (далее – НПВ) [2].

Основными видами отходов, содержащих СОЗ в Казахстане являются устаревшие и непригодные к использованию пестициды в сельском хозяйстве, а также оборудование, содержащее полихлорированные дифенилы (ПХД), используемое в промышленности и на транспорте.

Для регулирования вопросов обращения с СОЗ и отходами, содержащими СОЗ была разработана законодательная база, основным документом которой является Экологический ко-

Анисимова Наталья Михайловна (Anisimova Natalya Mikhailovna), ведущий специалист ОФ «Центра «Содействие устойчивому развитию», anissimova@gmail.com

Мустафина Вера Владиленовна (Mustafina Vera Vladilenovna), исполнительный директор ОФ «Центр «Содействие устойчивому развитию», veramustafina1@gmail.com

Гор Нина Викторовна (Gor Nina Viktorovna), менеджер проекта Программы развития Организации Объединенных Наций в Казахстане, nina.gor@undp.org

декс Республики Казахстан (далее ЭК РК). В ЭК РК установлены правила обращения со стойкими органическими загрязнителями и отходами, их содержащими. Важным положением является установка запретов на производство и импорт СОЗ и продукции, содержащей СОЗ, на захоронение отходов, содержащих СОЗ; на производство и использование пестицидов, в составе которых имеются СОЗ.

Кроме того, установлены запреты на производство и импорт продукции, содержащей СОЗ или в результате использования которой образуются СОЗ, а также продукции, в результате использования которой образуются отходы, содержащие СОЗ, предусмотренные международными договорами Республики Казахстан. Экспорт и импорт данных веществ разрешаются только для целей их уничтожения [3].

Отдельной статьей ЭК РК дается описание требований к хранению СОЗ содержащих отходов. Среди экологических требований при хранении отходов, содержащих СОЗ – требования оборудования пунктов хранения СОЗ содержащих отходов средствами защиты, обеспечивающими предотвращение влияния СОЗ на здоровье человека и окружающую среду. Производитель таких отходов должен иметь специальную систему регистрации для документирования производства, транспортировки и удаления этих отходов и несет ответственность за отходы до тех пор, пока их безопасное удаление не будет удостоверено. По поводу любых СОЗ (вещества, отходы) установлено, что они подлежат уничтожению экологически безопасным способом. Отходы, содержащие пестициды и СОЗ, не могут быть размещены на свалках [3].

Особые требования установлены к учету СОЗ содержащих отходов. В частности, учет СОЗ содержащих отходов должен вестись в журналах строгой отчетности, а кадастр таких отходов ведется отдельным разделом в рамках Государственного кадастра отходов. Важным является требование владельцам и собственникам СОЗ содержащих отходов разработать программу по их уничтожению до 2025 года [3].

Для выполнения требований ЭК РК были разработаны Правила обращения со стойкими органическими загрязнителями и отходами их содержащими. В первую очередь правила устанавливают порядок обращения с ПХД, охватывая весь жизненный цикл ПХД. Включают в себя инвентаризацию электрооборудования; эксплуатацию, вывод из эксплуатации ПХД-содержащего оборудования; упаковку, маркировку, организацию хранения и перевозку ПХД-содержащих отходов [4].

Кроме Экологического кодекса положения, связанные с обезвреживанием и захоронением

запрещенных, пришедших в негодность, пестицидов и тары из-под них содержатся в Законе «О защите растений» (далее – Закон). Законом установлено, что для обезвреживания используются специальные хранилища (могильники) [5]. Для выполнения требований Закона были разработаны Правила обезвреживания пестицидов (ядохимикатов), которые определяют порядок обезвреживания запрещенных, пришедших в негодность пестицидов и тары из-под них. В частности, установлено, что до момента безопасного хранения с последующей утилизацией или уничтожением запрещенные, пришедшие в негодность пестициды и тара из-под них должна храниться в складах, обеспечивающих их сохранность и предотвращение загрязнения окружающей среды [6].

Среди проблем, связанных с СОЗ-содержащими отходами основное место в стране принадлежит пестицидам в сельском хозяйстве. Следует отметить, что пестициды со свойствами СОЗ в Казахстане никогда не производились, они не экспортируются и не импортируются, тем более, что экспорт и импорт СОЗ-пестицидов запрещены в соответствии с требованиями законодательства.

Однако на территории Казахстана накоплены значительные количества СОЗ-пестицидов, ранее произведенных и использованных в бывшем СССР. Кроме того, имеются многочисленные загрязнения почв отходами пестицидов со свойствами СОЗ.

Для решения проблем устаревших пестицидов (порядка 10% которых содержат СОЗ), в частности, их идентификации, инвентаризации, хранения и уничтожения, а также тары из-под них, Казахстану большую помощь оказывает ПРООН. В рамках проекта ПРООН/ГЭФ «Начальная помощь Республике Казахстан по выполнению обязательств по Стокгольмской конвенции о СОЗ» была проведена предварительная инвентаризация СОЗ-пестицидов в 2003 году. В частности, было обнаружено 727 складов и 15 могильников, содержащих пестициды. В частности, в Северо-Казахстанской области обнаружен токсафен-15 тонн; в Атырауской области – гексахлорциклогексан (ГХЦГ) – 24 тонны; в Восточно-Казахстанской области – 0,5 тонн ДДТ.

В 2006-2008 гг. большая часть этих пестицидов была захоронена, но работа по инвентаризации была продолжена. По данным Министерства энергетики (сейчас Министерство экологии, геологии и природных ресурсов) на 2014 год общее количество устаревших пестицидов, хранящихся на различных объектах Казахстана, достигло 1 617 637,75 кг (л) и тары из-под них более 169 660 штук. Это неокончательные данные, продолжается более детальная оценка устаревших пестицидов, многие из которых представляют собой



Рис. Могильники пестицидов Казахстана

смеси неизвестного состава, нуждаются в идентификации, могут содержать СОЗ.

На рисунке показано расположение могильников пестицидов в Казахстане (по данным на 2010 год).

Помимо устаревших пестицидов в 2003 году началась работа по выявлению ПХД содержащего оборудования и соответствующих отходов. В результате предварительной инвентаризации на крупных предприятиях горно-металлургического и энергетического комплекса обнаружили 114 трансформаторов и более 50 тысяч конденсаторов, заполненных ПХД. Запасы ПХД были выявлены в 2004, 2005, 2009, 2012, 2013 и 2014 гг. В рамках Проекта ПРООН/ГЭФ в 2003-2006 гг. было обнаружено 8 участков, загрязненных ПХД.

Не менее остро стоит проблема утилизации и уничтожения ПХД-отходов. Работа в этом направлении началась в 2001 году. В частности, на Экибастузской электрической подстанции обнаружили порядка 15 тысяч разгерметизированных конденсаторов, содержащих ПХД, что представляло собой угрозу населению и окружающей среде из-за испарений трихлордифенила. В 2002 году конденсаторы были демонтированы и загерметизированы монтажной пеной. Грунт, впитавший в себя трихлордифенил, был снят и упакован в мешки. Всего вывезли 14 865 конденсаторов и 50 мешков с грунтом. Они были захоронены в специально оборудованном могильнике на Семипалатинском ядерном полигоне.

Следует отметить большую проведенную работу по утилизации ПХД заполненных трансформаторов и конденсаторов в АО «АрселорМиттал Темиртау» (далее АМТ). Здесь предусмотрен

слив и уничтожение совтола со 105 трансформаторов. В 2010-2011 гг. был оборудован склад временного хранения (бывшая газгольдерная) демонтированных трансформаторов и произведен поэтапный слив совтола в специальные бочки.

Аналогичная работа была проведена на Атырауском нефтеперерабатывающем заводе (АНПЗ), Степногорском подшипниковом заводе (СПЗ), корпорации «Казахмыс».

Далее вся партия утилизированных отходов с вышеуказанных четырех предприятий были перевезены в Караганду на временное хранение на склад ТОО «Промотход Казахстан». В ноябре 2013 года было получено разрешение Франции на ввоз этих отходов, затем 2 апреля 2014 года вывезено самолетом 292 бочки с ПХД-отходами на завод Треди, где были уничтожены 2 июля 2014 года. Все четыре предприятия получили сертификаты об уничтожении ПХД-отходов.

Работа по утилизации ПХД-отходов продолжается. В сентябре 2014 года ТОО «Промотход» приступил к упаковке и сбору конденсаторов на шести предприятиях республики: Алатау Жарык Компаниясы – 338 конденсаторов (Алматинская область), Угольный департамент АМТ – 288 шт. (Карагандинская область), ТОО Казметизпром – 93 шт. (ВКО), ВК РЭК – 337 шт. (ВКО), Усть-Каменогорский конденсаторный завод – 4 шт. и Аксуйский ферросплавный завод – 1342 шт. (Павлодарская область). В декабре 2014 года все упакованные конденсаторы были собраны на складе в г. Караганде и в июне 2015 года двумя партиями вывезены во Францию и уничтожены (всего 152 тонны ПХД конденсаторов) [7].

Таблица

Данные о наличии ПХД-содержащего оборудования в Республике Казахстан (2015 год)

№ п/п	Наименование	Выявлено, шт.	Уничтожено, шт.	Захоронено, шт.	Остаток, в т. ч. эксплуатируется, шт.
1	Трансформаторы	166	33	0	133
2	Конденсаторы	52 861	12452	14865	25544
3	Конденсаторные установки	78	0	0	78
	Всего	53 105	25 936	14865	25755

В таблице представлены данные об имеющемся в Казахстане ПХД-оборудовании.

В 2007 г. было уничтожено 24,6 т загрязненного ПХД оборудования, в 2008 – 80,86 т и 90,73 т; в 2014 – 80,2 т. В целом за период реализации проекта из Казахстана было вывезено 232 тонны ПХД.

Необходимо отметить, что страна испытывает определенные трудности в решении проблем ПХД. Требуется совершенствования система управления, мониторинга и контроля ПХД-содержащего оборудования и нормативная база по экологически безопасному управлению эксплуатируемого оборудования (правила, инструкции); нет специально оборудованных помещений для временного хранения ПХД-содержащих отходов и технологий по уничтожению материалов и отходов, содержащих СОЗ. Также проблемой является утилизация тары из-под пестицидов. В связи с недостаточными мощностями перерабатывающих предприятий часто тара просто захоранивается в действующих могильниках. Кроме того, пока не утверждены ПДК содержания большинства СОЗ в различных средах (вода, воздух, почва).

В соответствии с требованиями Стокгольмской конвенции в Казахстане разработан план выполнения (далее – НПВ) обязательств Стокгольмской конвенции о СОЗ. Первый НПВ страна предоставила в Секретариат Стокгольмской конвенции 8 декабря 2009 г. В нем, была изложена информация о ситуации в Казахстане с СОЗ, перечисленными в приложении А и В (алдрин, гексахлорбензол, гептахлор, диэлдрин, мирекс, токсафен, хлордан, эндрин, полихлорбифенилы (ПХБ) и диоксины, ДДТ). Обновленный НПВ (первый вариант) был представлен в Секретариат 30 апреля 2015 г. для отражения ситуации с 9 новыми

СОЗ, добавленными в приложение А после 2009 и 2011 гг., и с эндосульфаном.

В 2017 году подготовлен второй вариант обновленного НПВ в рамках совместного проекта Правительства РК/ПРООН/ГЭФ «Обновление плана выполнения, интеграция управления стойкими органическими загрязнителями в процесс национального планирования и рационального управления медицинскими отходами в Казахстане». Данный НПВ содержит оценку новых СОЗ (2009 и 2011 года), данные инвентаризации новых СОЗ (ПБДЭ и ПФОС) и обновленные данные по инвентаризации непреднамеренно образующихся СОЗ, а также меры, направленные на решение этих проблем [8].

В целом необходимо отметить следующие направления в решении проблем СОЗ, которые необходимо выполнить Казахстану:

- закончить инвентаризацию по выявлению запасов СОЗ, СОЗ-содержащих отходов и участков, загрязненных СОЗ, в том числе новыми СОЗ;
- обеспечить экологически безопасное и эффективное управление СОЗ-отходами и запасами СОЗ в соответствии с требованиями Стокгольмской и других международных конвенций;
- принимать меры для обеспечения того, чтобы отходы собирались, транспортировались и хранились экологически безопасным образом; уничтожение СОЗ-содержащих отходов происходило экологически обоснованным способом и экономически выгодным путем;
- выполнять требования Базельской конвенции о контроле за трансграничной перевозкой опасных отходов и их удалением, т.е. не перемещать СОЗ-отходы через международные границы без учёта международных правил;
- в отчетность по регистрам выбросов и переноса загрязнителей (РВПЗ) включить отходы, содержащие СОЗ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Закон Республики Казахстан от 7 июня 2007 года N 259 «О ратификации Стокгольмской конвенции о стойких органических загрязнителях».
2. Национальный план выполнения обязательств Республики Казахстан по Стокгольмской конвенции о стойких органических загрязнителях (далее - НПВ). Утвержден Приказом Министра

охраны окружающей среды 8 декабря 2009 года.
3. Экологический кодекс Республики Казахстан от 9 января 2007 года №212-III (с изменениями и дополнениями по состоянию на 26.12.2019 г.).
4. Правила обращения со стойкими органическими загрязнителями и отходами их содержащими. Приказ Министра ох-

раны окружающей среды от 24 февраля 2012 года № 40-Ө.
5. Закон Республики Казахстан «О защите растений» от 3 июля 2002 года № 331-II.
6. Правила обезвреживания пестицидов (ядохимикатов). Приказ Министра сельского хозяйства Республики Казахстан от 29 сентября 2015 года №15-05/864.

7. Сайт ПРООН в Казахстане. Официальный ресурс. 2015. 9 июля.
8. URL:<http://www.kz.undp.org/content/kazakhstan/ru/home/presscenter/pressreleases/2015/07/09/-152-2.html> 14.05.2020.

REFERENCES:

1. Law of the Republic of Kazakhstan dated June 7, 2007 N 259 "On Ratification of the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants" (In Russian).
2. National plan for fulfilling the obligations of the Republic of Kazakhstan under the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants (hereinafter -

NP). Approved by the Order of the Minister of Environmental Protection on December 8, 2009 (In Russian).
3. Environmental Code of the Republic of Kazakhstan dated January 9, 2007 No. 212-III (with amendments and additions as of December 26, 2019) (In Russian).
4. Rules for the handling of persistent organic pollutants and waste containing

them. Order of the Minister of Environmental Protection dated February 24, 2012 No. 40-Ө (In Russian).
5. Law of the Republic of Kazakhstan "On Plant Protection" dated July 3, 2002 No. 331-II (In Russian).
6. Rules for the neutralization of pesticides. Order of the Minister of Agriculture of the Republic of Kazakhstan

dated September 29, 2015 No. 15-05 / 864 (In Russian).
7. UNDP Kazakhstan website. Official resource. 2015.9 July (In Russian).
8. URL:<http://www.kz.undp.org/content/kazakhstan/ru/home/presscenter/pressreleases/2015/07/09/-152-2.html> 14.05.2020 (In Russian).

N.M. Anisimova¹, V.V. Mustafina¹, N.V. Gor²

RESOLUTION OF ISSUES OF REGULATION OF WASTE CONTAINING PERSISTENT ORGANIC POLLUTANTS IN THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

¹The Public Fund «Center «Cooperation for Sustainable Development», 050022, Almaty, Republic of Kazakhstan

²United Nations Development Program in Kazakhstan / United Nations Office in Nur-Sultan, 010000, Nur-Sultan, Republic of Kazakhstan

The article presents an analysis of the legislative framework of the Republic of Kazakhstan for regulating the management of POPs-containing waste, examines the experience of regulating POPs-pesticides, POPs-containing equipment and waste, disposal and destruction of PCB waste, and reviews the plan for fulfilling the obligations of the Stockholm Convention on POPs.

Keywords: *persistent organic pollutants (POPs), waste, POP-containing waste, waste management, Republic of Kazakhstan, polychlorinated biphenyls (PCBs).*

Quote: N.M. Anisimova, V.V. Mustafina, N.V. Gor. Resolution of issues of regulation of waste containing persistent organic pollutants in the Republic of Kazakhstan. *Toxicological Review*. 2021; 1:58-62.

Материал поступил в редакцию 25.01.2021 г.



ЮБИЛЕЙНЫЕ ДАТЫ

ОСТАПЕНКО ЮРИЙ НИКОЛАЕВИЧ

(к 80-летию со дня рождения)

23 января 2021 г. исполнилось 80 лет Юрию Николаевичу Остапенко – руководителю отдела развития федерального банка по острой химической патологии Научно-практического токсикологического центра ФМБА России, главному внештатному специалисту-токсикологу Минздрава России и Департамента здравоохранения г. Москвы, заслуженному врачу Российской Федерации.

Ю.Н. Остапенко работает в системе здравоохранения 60 лет и имеет большой опыт в оказании экстренной, неотложной и специализированной медицинской помощи как на догоспитальном этапе, так и в стационарных условиях.

Свою трудовую деятельность Юрий Николаевич начал еще со студенческих лет, работая медбратом в старейших больницах Санкт-Петербурга: больнице им. В.В. Куйбышева (Мариинская больница) – 1961-1962 гг. и Клинике военно-полевой терапии Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова – 1962-1964 гг. После окончания в 1964 г. Ленинградского педиатрического медицинского института, (специальность по диплому – педиатрия) работал практическим врачом-педиатром в амбулаторно-поликлинических учреждениях г. Южно-Сахалинска (1964-1967 гг.) и г. Москвы (1967-1968), инспектором-врачом в Министерстве здравоохранения РСФСР (1968-1970 гг.), врачом скорой медицинской помощи (1970 г.) Комитета здравоохранения г. Москвы.

С 1971 г. основной профессиональной деятельностью Ю.Н. Остапенко является клиническая токсикология: работа в должности врача-токсиколога, далее – заведующего отделением Республиканского центра по лечению острых отравлений для психических больных НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского. После организации кафедры клинической токсикологии ЦОЛИУ являлся ассистентом, затем доцентом кафедры (1986-1995 года), продолжая по совместительству работать врачом токсикологической реанимационно-консультативной бригады Стан-



ции скорой и неотложной медицинской помощи г. Москвы. В 1985 году успешно защитил кандидатскую диссертацию на тему: «Детоксикация при острых отравлениях на догоспитальном этапе», результатом которой явилось внедрение в клиническую практику скорой медицинской помощи метода детоксикационной гемосорбции.

С 1995 г. по 2015 г. – директор, с 2015 г. по настоящее время – руководитель отдела развития федерального банка по острой химической патологии Научно-практического токсикологического центра ФМБА России, совмещая с 1995 года работает должности ведущего научного сотрудника отделения острых отравлений НИИ им. Н.В. Склифосовского и доцента кафедры клинической токсикологии ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России. В своей работе Юрий Николаевич активно сочетает традиционные формы обучения и предоставления врачебных и консультационных услуг с инновационными технологиями и средствами телекоммуникаций для дистанционного обмена медицинской информацией в целях диагностики, лечения и профилактики острых химических отравлений, информационно-педагогическими технологиями в системе ИТ-образования для непрерывного постдиплом-

ного образования врачей токсикологов и современным форматом онлайн проведения научно-практических конференций.

Основные направления научной работы Ю.Н. Остапенко – проблемы организации токсикологической помощи в Российской Федерации, вопросы информатизации в клинической токсикологии, разработка клинических рекомендаций и стандартов оказания медицинской помощи при острых отравлениях химической этиологии. Под его непосредственным руководством разработаны информационные, нормативно-методические и технологические основы специализированной медицинской помощи населению при острых химических воздействиях для 43 центров/отделений отравлений, работающих в 39 основных промышленных субъектах РФ и образующих национальную систему токсикологической помощи.

Под руководством Ю.Н. Остапенко разработаны Приказы МЗ РФ № 460 от 29.12.2000 г. «Об утверждении учетной документации токсикологического мониторинга», № 9 08.01.02 «О мерах по совершенствованию организации токсикологической помощи населению Российской Федерации», от 21.02.05 № 152 «О дальнейшем развитии информационно-консультативной токсикологической помощи населению Российской Федерации» и от 15.11.2012 г. № 925н «Об утверждении Порядка оказания медицинской помощи больным с острыми химическими отравлениями». Является автором более 300 научных публикаций.

Опытный организатор здравоохранения и ведущий специалист в области клинической токсикологии, владеющий вопросами экстренной диагностики и оказания неотложной медицинской помощи при отравлениях на догоспитальном этапе, в стационаре, при массовых острых отравлениях, Ю.Н. Остапенко пользуется большим уважением и имеет высокий авторитет у российских и зарубежных специалистов, занимающихся вопросами токсикологии и смежных дисциплин. Неоднократно участвовал в семинарах, проводимых Международной программой химической безопасности (МПХБ) в качестве представителя Российской Федерации, а также приглашенного

консультанта-токсиколога. Постоянный участник научных конференций, проводимых Европейской ассоциацией токсикологических центров и клинических токсикологов. Является членом различных научных и общественных организаций: Проблемной комиссии научно-технического совета ФМБА России. секции медико-биологических проблем Экспертного совета Комитета по обороне Государственной Думы Российской Федерации, Правления Всероссийской общественной организации токсикологов, Европейской ассоциации токсикологических центров и клинических токсикологов, редколлегии журнала «Токсикологический вестник».

Мы очень благодарны и признательны Юрию Николаевичу за многолетний добросовестный труд, за бесценный опыт и неоценимый вклад в развитие отечественной клинической токсикологии. Требовательность к себе и окружающим, отзывчивость и справедливость, интеллигентность и тактичность, острый ум и тонкое чувство юмора Юрия Николаевича во многом способствуют созданию психологически здоровой атмосферы в рабочем коллективе.

Желаем Юрию Николаевичу неугасающего интереса к жизни, крепкого здоровья, душевного спокойствия и новых успехов в его активной научно-практической и педагогической деятельности.

**ФГБУ «Научно-практический токсикологический центр Федерального медико-биологического агентства»
ГУЗМ «НИИ скорой помощи им Н.В. Склифосовского» Департамента здравоохранения г. Москвы
ГБОУ ДПО Российская медицинская академия последипломного образования
Министерства здравоохранения Российской Федерации
Межрегиональная общественная организация «Ассоциация клинических токсикологов»
Редколлегия журнала «Токсикологический вестник»**

