

# ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ ВЕСТНИК

*Toxicological Review*



Научно-практический журнал  
Издается с июля 1993 года, выходит 1 раз в 2 месяца

№ 3 (156), 2019

СОДЕРЖАНИЕ

CONTENTS

## Г.А. Софронов

О ТВОРЧЕСКОМ НАСЛЕДИИ АКАДЕМИКА РАМН  
С.Н. ГОЛИКОВА..... 2

**Н.С. Осечкина, Г.В. Назаров, М.Б. Иванов,  
Е.Г. Батоцыренова, В.А. Кашуро, Н.В. Лапина,  
О.В. Варламова, И.С. Кравцов, А.В. Бабкин, А.С. Краева,  
А.С. Мелехова, К.О. Войцехович, Д.С. Лисицкий**  
ВЛИЯНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА GABRA2 НА СТЕПЕНЬ  
ОТРАВЛЕНИЯ КРЫС ПРИ ОСТРОЙ ИНТОКСИКАЦИИ  
ЭТАНОЛОМ..... 3

**Т.Д. Панова, А.Ю. Дмитриев, С.Б. Борзаков,  
С.Г. Ленник, Г.М. Кабирова, А.Н. Быченко, Д.А. Желтов,  
М.А. Эдомская, П.В. Ижевский**  
УСТАНОВЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ТОКСИЧНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ  
В ВОЛОСАХ ПЕРВОЙ РУССКОЙ ЦАРИЦЫ АНАСТАСИИ  
РОМАНОВНЫ ..... 8

**Ю.Ю. Ивницкий, Т.В. Шефер, А.А. Тяптин, В.Л. Рейнюк**  
ИЗМЕНЕНИЯ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА КРОВИ И  
ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ  
МИЕЛОАБЛЯЦИОННОГО РЕЖИМА ПРИМЕНЕНИЯ  
ЦИКЛОФОСФАНА ..... 13

**В.Н. Бабаков, Н.Ю. Роговская, И.Д. Курдюков,  
П.П. Бельтюков, С.А. Дулов, А.С. Радилев**  
ВЛИЯНИЕ АГОНИСТОВ АРИЛГИДРОКАРБОНОВОГО  
РЕЦЕПТОРА И ЛИПОПОЛИСАХАРИДА НА МАРКЕРЫ  
ГЕНОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ БЕНЗ(А)ПИРЕНА..... 19

**Д.А. Белинская, А.А. Баталова, Н.В. Гончаров**  
ВЛИЯНИЕ ЖИРНЫХ КИСЛОТ НА СВЯЗЫВАЮЩУЮ  
И ЭСТЕРАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ АЛЬБУМИНА ПО  
ОТНОШЕНИЮ К ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИМ СОЕДИНЕНИЯМ  
ПО ДАННЫМ МОЛЕКУЛЯРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ ..... 26

**О.М. Алексеева, А.В. Кременцова, А.В. Кривандин,  
О.В. Шаталова, Ю.А. Ким**  
МОДЕЛЬНЫЕ БИОМЕМБРАНЫ, КАК ТЕСТ-ОБЪЕКТЫ ДЛЯ  
ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИОННЫХ ДИАПАЗОНОВ  
ВРЕДНЫХ ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ  
СРЕДАХ И ОБЪЕКТАХ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ ..... 33

**В.Д. Гладких, Г.В. Вершинина**  
ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ  
АНТИДОТНОЙ ТЕРАПИИ ОТРАВЛЕНИЙ ЦИАНИДАМИ..... 46

**И.М. Суханов**  
АГОНИСТЫ РЕЦЕПТОРОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ СО СЛЕДОВЫМИ  
АМИИНАМИ, 1-ГО ПОДТИПА КАК ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ МИШЕНЬ  
В ТЕРАПИИ ПСИХИЧЕСКИХ РАССТРОЙСТВ С НАРУШЕНИЯМИ  
ИМПУЛЬСИВНОКОМПУЛЬСИВНОГО КОНТРОЛЯ..... 51

**Н.В. Ходыкина, Л.П. Точилкина, О.Н. Новикова,  
М.С. Срослов, А.Я. Почепцов, Ю.И. Великородная**  
ОСТРАЯ ТОКСИЧНОСТЬ НАНОЧАСТИЦ ДИОКСИДА  
ЦЕРИЯ..... 56

□ Юбилейные даты  
К 90-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ  
ЧЛЕН-КОРРЕСПОНДЕНТА РАН  
Б.А. КУРЛЯНДСКОГО ..... 63

## G.A. Sofronov

ABOUT THE CREATIVE HERITAGE OF THE ACADEMICIAN OF THE  
RUSSIAN ACADEMY OF MEDICAL SCIENCES S.N. GOLIKOV ..... 2

**N.S. Osechkina, G.V. Nazarov, M.B. Ivanov,  
E.G. Batotsyrenova, V.A. Kashuro, N.V. Lapina,  
O.V. Varlamova, I.S. Kravtsov, A.V. Babkin, A.S. Kraeva,  
A.S. Melekhova, K.O. Voitsekhovich, D.S. Lisitskii**  
EFFECT OF POLYMORPHISM OF THE GABRA2 GENE ON  
THE DEGREE OF RAT POISONING IN ACUTE ETHANOL  
INTOXICATION ..... 3

**T.D. Panova, A.Yu. Dmitriev, S.B. Borzakov, S.G. Lennik,  
G.M. Kabirova, A.N. Bychenko, D.A. Zheltov, M.A. Edomskaya,  
P.V. Izhevskiy**  
DETERMINATION OF TOXIC ELEMENTS' CONTENT  
IN THE HAIR OF THE FIRST RUSSIAN TSARINA ANASTASIA  
ROMANOVNA ..... 8

**Yu.Yu. Ivnitky, T.V. Schäfer, A.A. Tyaptin, V.L. Rejniuk**  
CHANGES IN THE CHEMICAL COMPOSITION OF BLOOD AND  
BRAIN OF RATS UNDER THE CONDITIONS OF MODELING OF  
THE MYELOABLATION REGIMEN OF CYCLOPHOSPHAMIDE  
ADMINISTRATION ..... 13

**V.N. Babakov, N.Yu. Rogovskaya, I.D. Kurdyukov,  
P.P. Beltyukov, S.A. Dulov, A.S. Radilov**  
EFFECT OF ARYL HYDROCARBON RECEPTOR AGONISTS AND  
LIPOPOLYSACCHARIDE ON BENZO(A)PYRENE GENOTOXICITY  
MARKERS ..... 19

**D.A. Belinskaya, A.A. Batalova, N.V. Goncharov**  
EFFECTS OF FATTY ACIDS ON BINDING AND ESTERASE  
ACTIVITY OF ALBUMIN TOWARDS ORGANOPHOSPHORUS  
COMPOUNDS ACCORDING TO MOLECULAR MODELING  
APPROACH ..... 26

**O.M. Alekseeva, A.V. Krementsova, A.V. Krivandin,  
O.V. Shatalova, Yu.A. Kim**  
MODEL BIOMEMBRANES AS TEST OBJECTS FOR THE  
DETERMINATION OF CONCENTRATION RANGES OF HARMFUL  
CHEMICAL SUBSTANCES IN BIOLOGICAL MEDIUMS AND  
OBJECTS OF EXTERNAL ENVIRONMENT ..... 33

**V.D. Gladkikh, G.V. Vershinina**  
POTENTIAL DIRECTIONS OF THE IMPROVEMENT OF ANTIDOTE  
THERAPY OF CYANIDE POISONING ..... 46

**I.M. Sukhanov**  
TAAR1 AGONISTS AS A POTENTIAL TARGET  
IN THE THERAPY OF MENTAL DISORDERS WITH  
THE DEFICIT OF IMPULSIVE AND COMPULSIVE  
CONTROL..... 51

**N.V. Khodykina, L.P. Tochilkina, O.N. Novikova, M.S. Sroslov,  
A.Ya. Pocheptsov, Yu.I. Velikorodnaya**  
ACUTE TOXICITY OF CERIUM DIOXIDE  
NANOPARTICLES..... 56

□ Anniversary  
ON THE 90<sup>TH</sup> ANNIVERSARY OF THE CORRESPONDING  
MEMBER OF THE RUSSIAN ACADEMY OF SCIENCES  
B.A. KURLYANDSKY ..... 63

## О творческом наследии академика РАМН С.Н. Голикова

В настоящем выпуске журнала содержатся публикационные версии докладов, представленных их авторами на конференции «Актуальные вопросы токсикологии и фармакологии», посвящённой 100-летию со дня рождения выдающегося отечественного токсиколога академика РАМН С.Н. Голикова.

В богатом творческом наследии Сергея Николаевича Голикова достаточно отчётливо прослеживаются три основные направления научных исследований, тесно связанных между собой: токсикология высокотоксичных, преимущественно антихолинэстеразных, химических веществ, фармакология холинергических и антихолинергических лекарственных средств и фундаментальные обобщения биологической сущности токсического процесса, определённые им, как общие механизмы токсического действия химических веществ.

Академик РАМН Д.С. Саркисов – крупнейший патолог 20-го столетия, с которым С.Н. Голиков многие годы был дружен, любил повторять: «моя биография – это мои книги». Применительно к творческой биографии Сергея Николаевича это именно так.

Так, экспериментальные основы токсикологии антихолинэстеразных ядов, часто называемых сегодня синаптическими ядами, представлены в монографиях «Фармакология и токсикология фосфорорганических соединений» (1960, совместно с В.И. Розенгартом) и «Холинэстеразы и антихолинэстеразные вещества» (1964, совместно с В.И. Розенгартом). Фармакология холинергической передачи составила содержание таких книг, как «Синтетические атропиноподобные вещества» (1962, совместно с С.Г. Кузнецовым), «Стереоспецифичность действия лекарственных веществ» (1973, совместно с С.Г. Кузнецовым и Э.П. Зацепиным), «Холинергические механизмы высшей нервной деятельности» (1975, совместно с А.Т. Селивановой).

Предметом многолетних исследований С.Н. Голикова был токсический процесс, формируемый взаимодействием токсичных химических веществ с живыми организмами, а также создание активных противоядий (антидотов). Известна аксиома, что чем токсичнее химическое вещество, тем вероятнее наличие в живой материи локусов (рецепторов), обладающих высоким сродством к данному химическому агенту. Такими локусами могут быть, например, активные центры ферментов, либо рецепторы эндогенных лигандов. Вследствие этого исследования, целью которых является выяснение механизмов токсического действия какого-либо химического вещества, с неизбежностью касаются процессов межмолекулярных взаимодействий ядов и специфических воспринимающих структур на молекулярном уровне. В равной мере это касается поиска соответствующих антидотов.

Понятно, что С.Н. Голиков в таком контексте предстаёт, прежде всего, как классик в области молекулярной токсикологии и молекулярной фармакологии. Вместе с тем, Сергеем Николаевичем была сформулирована концепция общих механизмов токсичности химических веществ. «Согласно концепции общих механизмов токсичности химическая патология возникает тогда, когда регуляторные процессы на любом уровне структурно-функциональной организации живых систем перестают обеспечивать гомеостаз... Установление «общих механизмов» токсичности подразумевает необходимость изучения интоксикации на всей протяжённости патологического процесса». Эти суждения академика С.Н. Голикова взяты из его доклада «Общие механизмы токсичности» на 1-ом Всесоюзном съезде токсикологов, который состоялся в 1986 году в Ростове-на-Дону. В полном объёме концепция изложена в замечательной книге С.Н. Голикова, И.В. Саноцкого и Л.А. Тиунова «Общие механизмы токсического действия», 1986.

Творческий портрет С.Н. Голикова не был бы полным без упоминания целого ряда созданных коллективом химиков, фармакологов, токсикологов под руководством С.Н. Голикова лекарственных средств, используемых в клинической практике, а также антидотов, которые по сию пору спасают жизнь пострадавших: циклозил, хлорозил, глипин, педифен, пентифин, пеликсим и другие.

И, наконец, огромная научная школа отечественных токсикологов, созданная академиком С.Н. Голиковым, которая продолжает развиваться не только в родном для Сергея Николаевича Институте токсикологии, но и далеко за его стенами.

*Академик РАН Г.А. Софронов*

УДК 547.262 : 575.8

# ВЛИЯНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА GABRA2 НА СТЕПЕНЬ ОТРАВЛЕНИЯ КРЫС ПРИ ОСТРОЙ ИНТОКСИКАЦИИ ЭТАНОЛОМ

Н.С. Осечкина<sup>1</sup>, Г.В. Назаров<sup>1</sup>, М.Б. Иванов<sup>2</sup>,  
Е.Г. Батоцыренова<sup>2</sup>, В.А. Кашуро<sup>2</sup>,  
Н.В. Лапина<sup>2</sup>, О.В. Варламова<sup>1</sup>, И.С. Кравцов<sup>1</sup>,  
А.В. Бабкин<sup>1</sup>, А.С. Краева<sup>1</sup>, А.С. Мелехова<sup>2</sup>,  
К.О. Войцехович<sup>2</sup>, Д.С. Лисицкий<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное унитарное предприятие  
«Научный центр «Сигнал», 107014, г. Москва,  
Российская Федерация

<sup>2</sup>Федеральное государственное учреждение науки  
«Институт токсикологии Федерального медико-  
биологического агентства», г. Санкт-Петербург, 192019,  
Российская Федерация

**В**данной работе исследованы 4 полиморфных варианта гена *Gabra2* крыс: rs105733011, rs8168342, rs198286814, rs198837638, которые могут оказывать влияние на формирование различных биологических эффектов организма при воздействии этилового спирта. Для полиморфизма rs105733011 выявлено, что частота встречаемости генотипа СТ была значимо выше ( $p < 0,05$ ) среди животных группы «тяжелая степень интоксикации» - 37,0 %, чем в группе «легкая степень интоксикации» - 14 %. Для полиморфизма rs198286814 установлена тенденция к наиболее частой встречаемости генотипа АГ в группе животных с «тяжелой степенью интоксикации». Значимых различий в распределении частот встречаемости генотипов GG/AG у исследуемых групп для полиморфных локусов rs8168342 и rs198837638 не выявлено.

Сделано заключение, что полиморфизм rs105733011 может являться одним из генетических маркеров, позволяющих прогнозировать степень депримирующего действия этанола при острой алкогольной интоксикации.

**Ключевые слова:** интоксикация, ген *Gabra2*, генетический полиморфизм, этанол.

**Введение.** Патогенез цитотоксического поражения тканей при острых тяжелых отравлениях этанолом (в первую очередь, головного мозга) и развития синдрома полиорганной недостаточности связан с глубоким угнетением регуляторных функций ЦНС (центральной нервной системы) и развитием коматозного состояния, нарушениями со стороны дыхательной и сердечно-сосудистой систем, развитием гипоксии, активацией свободнорадикальных процессов, которые приводят к нарушениям метаболических процессов и гибели клетки [1, 2].

Различная чувствительность организма к высоким дозам этанола, разнообразие ранних и поздних осложнений диктуют необходимость разработки новых и совершенствования классических

подходов к диагностике и лечению данных отравлений [3, 4].

В ряде исследований было выявлено влияние полиморфизма гена, кодирующего ГАМК-А рецептор, на формирование различных биологических эффектов организма при воздействии этилового спирта [5, 6, 7]. Ген *Gabra2*, кодирующий  $\alpha 2$ -субъединицу ионотропного ГАМК-А рецептора, входит в кластер генов (*GABRA2* – *GABRA4* – *GABRB1* – *GABRG1*), локализованных на четвертой хромосоме в локусе 4p12 [5, 8]. На сегодняшний день в базе данных dbSNP для человека приведено свыше 30000 точечных полиморфизмов гена *Gabra2* [9]. Появление современных методов, основанных на проведении полногеномного поиска ассоциаций (Genome-Wide

Осечкина Наталья Сергеевна (Osechkina Natal'ya Sergeevna), младший научный сотрудник ФГУП «НЦ «Сигнал», dunats@rambler.ru  
Назаров Георгий Валерьевич (Nazarov Georgiy Valer'evich), главный научный сотрудник ФГУП «НЦ «Сигнал»  
Иванов Максим Борисович (Ivanov Maksim Borisovich), директор ФГБУН ИТ ФМБА России, m.b.ivanov@toxicology.ru  
Батоцыренова Екатерина Геннадьевна (Batotsyrenova Ekaterina Gennad'evna), заведующий отделом ФГБУН ИТ ФМБА России  
Кашуро Вадим Анатольевич (Kashuro Vadim Anatol'evich), заведующий лабораторией ФГБУН ИТ ФМБА России  
Лапина Наталья Вадимовна (Lapina Natal'ya Vadimovna), заведующий отделом ФГБУН ИТ ФМБА России, 192019, Санкт-Петербург  
Варламова Ольга Вячеславовна (Varlamova Olga Vyacheslavovna), младший научный сотрудник ФГУП «НЦ «Сигнал»  
Кравцов Иван Сергеевич (Kravtsov Ivan Sergeevich), начальник 4 НИО ФГУП «НЦ «Сигнал»  
Бабкин Александр Владимирович (Babkin Aleksandr Vladimirovich) заведующий лабораторией ФГУП «НЦ «Сигнал»  
Краева Анна Сергеевна (Kraeva Anna Sergeevna), научный сотрудник ФГУП «НЦ «Сигнал»  
Мелехова Александра Сергеевна (Melekhova Aleksandra Sergeevna), младший научный сотрудник ФГБУН ИТ ФМБА России  
Войцехович Карина Олеговна (Voicëhovich Karina Olegovna), младший научный сотрудник ФГБУН ИТ ФМБА России  
Лисицкий Дмитрий Сергеевич (Lisitskii Dmitrii Sergeevich), научный сотрудник ФГБУН ИТ ФМБА России

Association Studies, GWAS) позволило идентифицировать достоверную связь ряда полиморфизмов с развитием ответной реакции организма при употреблении этанола. Среди проводимых исследований большая часть посвящена поиску генетических маркеров предрасположенности к алкоголизму. Так в исследовании Howard J. Edenberg была показана достоверная ассоциация для 31 SNP (из 48-ми исследованных однонуклеотидных замен гена *Gabra2*) с развитием алкогольной зависимости [10]. Наряду с этим, в последнее время интерес ученых сосредоточен на поиске связи не только генетических маркеров предрасположенности к заболеванию, но и связанных с тяжестью течения и/или исходом болезни. В одной из таких работ была обнаружена ассоциация полиморфизмов генов цитохрома P-450E1 (*CYP2E1* и *CYP1A1*) и фактора некроза опухолей (*TNF*) со степенью тяжести алкогольного поражения печени. Проведенный молекулярно-генетический анализ полиморфизма генов цитохрома P-450 показал, что риск развития алкогольной болезни печени ассоциирован с генотипами C1C2 гена *CYP2E1* и Ile/Val гена *CYP1A1*, а степень тяжести алкогольного поражения печени – с генотипом C1C2 гена *CYP2E1* [11].

Несмотря на достаточное число публикаций, посвященных ассоциации генетических маркеров с развитием различных эффектов действия этанола на организм, на сегодняшний день в литературе представлено незначительное количество информации о связи полиморфизмов генов ГАМК-ергической системы со степенью угнетения функций ЦНС.

Учитывая вклад  $\alpha 2$ -субъединицы ионотропного ГАМК-А рецептора на развитие широкого спектра депримирующих эффектов при интоксикации этанолом, возможно использование гена *Gabra2* в качестве гена-кандидата, изменение структуры и функции которого может вносить вклад в развитие состояний, сопровождающихся угнетением функций ЦНС. Таким образом, целью данной работы являлось установление ассоциации вариантов гена *Gabra2* со степенью отравления белых беспородных крыс при острой интоксикации этанолом.

**Материалы и методы исследования.** Эксперименты выполнены на белых нелинейных крысах-самцах массой 180–240 г, содержащихся в условиях вивария (питомник РАМН «Рапполово», Ленинградская область). Длительность акклиматизационного периода для животных составляла 14 дней. Животные содержались в соответствии с требованиями GLP. За 12 ч до начала эксперимента животных не кормили. Для моделирования различной степени угнетения функций нервной системы (оглушение-сопор-кома) 33 % раствор этанола вводили животным внутривенно

в дозе 0,8ЛД<sub>50</sub> (5,1 г/кг). Наблюдение за крысами осуществляли в течение 8 часов после введения этанола.

Для оценки состояния экспериментальных крыс при остром отравлении этанолом использовали алгоритм, разработанный в работе Башарина В.А. [12].

Методика проведения генотипирования однонуклеотидных полиморфизмов гена *Gabra2* описана в исследовании, проведенном нами ранее [13].

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Statistica 8.0. Ассоциацию между степенью угнетения функционирования ЦНС и генотипом определяли с помощью критерия  $\chi^2$  – критерия Пирсона (при условии, когда объем выборки не превышал 5 случаев, использовали критерий  $\chi^2$  с поправкой Йетса, либо двусторонний точный критерий Фишера), сравнивая распределение генотипов по каждому полиморфизму между группами. Относительный риск развития степени угнетения ЦНС по конкретному генотипу вычисляли как «отношение шансов» (OR-odds ratio). Значения отношения шансов с 95 % доверительным интервалом рассчитывали используя он-лайн программу «Калькулятор для расчета отношения шансов» [14]. Значение OR = 1 рассматривали как отсутствие ассоциации, OR > 1 – как положительную ассоциацию (повышенный риск развития степени угнетения ЦНС), OR < 1 – как отрицательную ассоциацию (пониженный риск развития степени угнетения ЦНС).

**Результаты и обсуждение.** В ходе настоящего исследования изучалась ассоциация однонуклеотидных полиморфизмов rs105733011, rs8168342, rs198286814, rs198837638 гена *Gabra2* со степенью угнетения ЦНС животных после острой интоксикации этанолом. Результаты генотипирования по исследуемым локусам представлены в таблице 1.

Для оценки ассоциаций исследуемых полиморфизмов со степенью угнетения ЦНС после введения этанола животные были разделены на две группы. Крысы, состояние которых через 8 часов после острого воздействия этанолом оценивалось как «физиологическая норма» и «оглушение», вошли в группу «легкая степень интоксикации». Животные, находящиеся в состоянии «сопор», «поверхностная кома», «глубокая кома», «терминальная кома», «летальный исход», были объединены в группу «тяжелая степень интоксикации». Объединение животных на основании состояния (общий признак) в одну группу использовалось для оценки статистической значимости результатов при небольшой выборке.

При сравнительном анализе распределения генотипов для полиморфизма гена *Gabra2* (rs105733011), выявлено, что частота встречаемо-

Таблица 1

## Распределение частот генотипов Gabra2 у крыс после острой интоксикации этанолом

№	Наименование полиморфизма	Генотип	Абсолютные частоты генотипов						
			Экспертная оценка, баллов*						
			1	2	3	4	5	6	7
1	rs105733011 (n=98) <sup>#</sup>	CC	30	38	7	1	0	0	4
		CT	7	4	4	1	0	0	2
		TT	0	0	0	0	0	0	0
2	rs8168342 (n=86)	GG	29	31	8	1	0	0	3
		AG	6	4	2	0	0	0	2
		AA	0	0	0	0	0	0	0
3	rs198286814 (n=100)	AA	31	39	8	1	0	0	4
		AG	7	4	3	1	0	0	2
		GG	0	0	0	0	0	0	0
4	rs198837638 (n=99)	GG	32	40	8	2	0	0	3
		AG	6	3	3	0	0	0	2
		AA	0	0	0	0	0	0	0

Примечание: \* экспертная оценка в баллах: 1 – физиологическая норма, 2 – оглушение, 3 – сопор, 4 – поверхностная кома, 5 – глубокая кома, 6 – терминальная кома, 7 – летальный исход; <sup>#</sup>n – количество животных (вариабельность параметра обусловлена особенностями метода генотипирования)

Таблица 2

## Сравнительный анализ распределения частот генотипов полиморфизмов гена Gabra2 у животных после острой интоксикации этанолом

	Наименование полиморфизма	Генотип	Абсолютные частоты генотипов (относительные частоты генотипов, %)		p	$\chi^2$
			«легкая степень интоксикации»	«тяжелая степень интоксикации»		
1	rs105733011 (n=98)	CC	68 (86,0)	12 (63,0)	0,042	5,36
		CT	11 (14,0)	7 (37,0)		
2	rs8168342 (n=86)	GG	60 (85,0)	12 (75,0)	0,284	1,10
		AG	10 (15,0)	4 (25,0)		
3	rs198286814 (n=100)	AA	70 (86,0)	13 (68,0)	0,086	3,53
		AG	11 (14,0)	6 (32,0)		
4	rs198837638 (n=99)	GG	72 (79,0)	13 (72,0)	0,125	3,37
		AG	9 (21,0)	5 (28,0)		

Примечание: p – уровень значимости, n – количество животных

сти генотипа СТ была значимо выше ( $p < 0,05$ ) среди животных группы «тяжелая степень интоксикации» – 37,0 %, чем в группе «легкая степень интоксикации» – 14 % (табл. 2).

По результатам расчета показателя отношения шансов ( $OR = 3,62$ ) можно предположить, что носительство аллеля Т в гетерозиготном состоянии в 3,5 раза увеличивает риск развития тяжелых неврологических состояний («сопор», «поверхностная кома», «глубокая кома», «терминальная кома») при острой интоксикации этанолом.

Среди полиморфизмов rs8168342, rs198286814, rs198837638, локализованных в 3' – UTR области гена *Gabra2*, установлена тенденция к наиболее частой встречаемости генотипа AG (rs198286814) в группе животных с «тяжелой степенью интоксикации», что может свидетельствовать о существовании связи между полиморфизмом гена кодирующего 2-субъединицу ионотропного ГАМК-А рецептора и реакцией ЦНС на острую интоксикацию этанолом. Результаты, приближающиеся к уровню значимости, указывают на необходимость увеличения объема выборки в последующих исследованиях.

Таким образом, среди исследуемых однонуклеотидных точечных замен статистически значимые результаты были выявлены для полиморфизма rs105733011, локализованного в кодирующей части (экзоне) нуклеотидной последовательности гена *Gabra2*.

Полученные данные согласуются с данными литературы о том, что данный полиморфизм, являясь синонимичной заменой, может влиять на сплайсинг и стабильность мРНК, что впоследствии приводит к изменению фенотипа [15].

**Заключение.** В ходе настоящего исследования было изучено распределение частот генотипов полиморфизмов rs105733011, rs8168342, rs198286814, rs198837638 гена *Gabra2* у белых беспородных крыс через 8 часов после острой интоксикации этанолом. В результате проведенного анализа была установлена статистически значимая ассоциация ( $p < 0,05$ ) полиморфизма rs105733011 со степенью угнетения ЦНС животных после алкогольной интоксикации. Для полиморфизма rs198286814 установлена тенденция к наиболее частой встречаемости генотипа AG в группе животных с «тяжелой степенью интоксикации». Значимых различий в распределении частот встречаемости генотипов GG/AG у исследуемых групп для полиморфных локусов rs8168342 и rs198837638 не выявлено.

Таким образом, полиморфизм rs105733011 гена *Gabra2* может являться одним из генетических маркеров, позволяющих прогнозировать тяжесть депримирующего действия этанола при острой алкогольной интоксикации.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кашуро В.А., Батоцыренова Е.Г., Иванов М.Б., Степанов С.В., Скоморохова Е.Б. Изучение нейротрофических маркеров при острых тяжелых отравлениях этанолом. Экспериментальная и клиническая фармакология. 2015; 78 (S): 31.
2. Батоцыренова Е.Г., Кашуро В.А. Влияние полулетальной дозы этанола на активность NA,K-АТФАЗы мозга крыс. В сборнике: Закономерности к тенденции развития науки в современном обществе. 2013. С. 43-47.
3. Кашуро В.А., Карпищенко А.И., Куценко С.А., Глушков С.И. Возможность использования определения показателей системы глутатиона в лабораторной диагностике осложнений курсового лечения циклофосфаном. Клиническая лабораторная диагностика. 2002; 10:43.
4. Осечкина Н.С., Назаров Г.В., Бонитенко Е.Ю., Иванов М.Б., Кашуро В.А., Лапина Н.В. и др. Генетические особенности, определяющие различие эффектов воздействия этанола на организм. Medline.ru. Российский биомедицинский журнал. 2013; 14 (4): 993 – 1007.
5. Li D, Sulovari A, Cheng C, Zhao H, Kranzler H.R, Gelernter J. Association of gamma-aminobutyric acid A receptor  $\alpha 2$  gene (GABRA2) with alcohol use disorder. Neuropsychopharmacology. 2014; 39(4): 907 – 18.
6. Wei Q, Ye Y, Chen F, Li J, Wu H, Fu Y et al. Polymorphism study of nine SNPs associated with subjective response to alcohol in Chinese Han, Hui, Tibetan, Mongolian and Uygur populations. Forensic Sci Res. 2018; 3(2):124 – 129.
7. Roh S, Matsushita S, Hara S, Maesato H, Matsui T, Suzuki G. et al. Role of GABRA2 in moderating subjective responses to alcohol. Alcohol Clin Exp Res. 2011; 35(3):400 – 7.
8. Lindemeyer A.K, Shen Y, Yazdani F, Shao X.M, Spigelman I, Davies D.L, et al.  $\alpha 2$  subunit-containing GABAA receptor subtypes are upregulated and contribute to alcohol-induced functional plasticity in the rat hippocampus. Mol Pharmacol. 2017; 92(2):101 – 112.
9. NCBI/dbSNP (2019). Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?term=Gabra2> (accessed 28 February 2019).
11. Edenberg H.J, Dick D.M, Xuei X, Tian H, Almasy L, Bauer L.O. et al. Variations in GABRA2, encoding the alpha 2 subunit of the GABA(A) receptor, are associated with alcohol dependence and with brain oscillations. Am J Hum Genet. 2004; 74(4):705 – 14.
12. Шангареева З.А. Полиморфизм ДНК-локусов генов-кандидатов алкогольной болезни печени: Дис. ... канд биол наук. М.; 2005.
13. Башарин В.А. Нейропептиды и субстраты энергетического обмена в терапии тяжелых отравлений депримирующими веществами: Дис. ... докт. мед. наук. С-П.; 2011.
14. Осечкина Н.С., Назаров Г.В., Бонитенко Е.Ю., Иванов М.Б., Кашуро В.А., Лапина Н.В. и др. Влияние экспрессии и полиморфизма генов, кодирующих гамк-рецепторы, на тяжесть депримирующего действия этанола у крыс. Токсикологический вестник. 2014; №6. С. 22– 27.
15. «Калькулятор для расчета отношения шансов». Available at: <http://medstatistic.ru/calculators/calcodds.html> (accessed 12 February 2019).
16. Duan J, Wainwright M.S, Comeron J.M, Saitou N, Sanders A.R, Gelernter J, et al. Synonymous mutations in the human dopamine receptor D2 (DRD2) affect mRNA stability and synthesis of the receptor. Hum. Mol. Genet. 2003; 12:205–216.

## REFERENCES:

1. Kashuro V.A., Batotsyrenova E.G., Ivanov M.B., Stepanov S.V., Skomorokhova E.B. The study of neurotrophic markers in acute severe ethanol poisoning. Experimental and clinical pharmacology. 2015; 78 (S): 31 (in Russian).
2. Batotsyrenova E.G., Kashuro V.A. The effect of a semi-lethal dose of ethanol on the activity of NA, K-ATFASy rat brain. In the collection: Patterns to the development trend of science in modern society. 2013. С. 43-47 (in Russian).
3. Kashuro V.A., Karpishchenko A.I., Kutsenko S.A., Glushkov S.I. The possibility of using the definition of indicators of the glutathione system in the laboratory diagnosis of complications of a course of treatment with cyclophosphane. Clinical laboratory diagnosis. 2002; 10:43 (in Russian).
4. Osechkina N.S., Nazarov G.V., Bonitenko E.Ju., Ivanov M.B., Kashuro V.A., Lapina N.V. et al. The genetic factors, which define the different action's effects of ethanol for an organism. Medline.ru. 2013; 14 (4): 993 – 1007 (in Russian).
5. Li D, Sulovari A, Cheng C, Zhao H, Kranzler H.R, Gelernter J. Association of gamma-aminobutyric acid A receptor  $\alpha 2$  gene (GABRA2) with alcohol use disorder. Neuropsychopharmacology. 2014; 39(4): 907 – 18.
6. Wei Q, Ye Y, Chen F, Li J, Wu H, Fu Y et al. Polymorphism study of nine SNPs associated with subjective response to alcohol in Chinese Han, Hui, Tibetan, Mongolian and Uygur populations. Forensic Sci Res. 2018; 3(2):124 – 129.
7. Roh S, Matsushita S, Hara S, Maesato H, Matsui T, Suzuki G. et al. Role of GABRA2 in moderating subjective responses to alcohol. Alcohol Clin Exp Res. 2011; 35(3):400 – 7.
8. Lindemeyer A.K, Shen Y, Yazdani F, Shao X.M, Spigelman I, Davies D.L, et al.  $\alpha 2$  subunit-containing GABAA receptor subtypes are upregulated and contribute to alcohol-induced functional plasticity in the rat hippocampus. Mol Pharmacol. 2017; 92(2):101 – 112.
9. NCBI/dbSNP (2019). Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?term=Gabra2> (accessed 28 February 2019).
11. Edenberg H.J, Dick D.M, Xuei X, Tian H, Almasy L, Bauer L.O. et al. Variations in GABRA2, encoding the alpha 2 subunit of the GABA(A) receptor, are associated with alcohol dependence and with brain oscillations. Am J Hum Genet. 2004; 74(4):705 – 14.
12. Шангареева З.А. Полиморфизм ДНК-локусов генов-кандидатов алкогольной болезни печени: Дис. ... канд биол наук. М.; 2005.
13. Башарин В.А. Нейропептиды и субстраты энергетического обмена в терапии тяжелых отравлений депримирующими веществами: Дис. ... докт. мед. наук. С-П.; 2011.
14. Осечкина Н.С., Назаров Г.В., Бонитенко Е.Ю., Иванов М.Б., Кашуро В.А., Лапина Н.В. и др. Влияние экспрессии и полиморфизма генов, кодирующих гамк-рецепторы, на тяжесть депримирующего действия этанола у крыс. Токсикологический вестник. 2014; №6. С. 22– 27.
15. «Калькулятор для расчета отношения шансов». Available at: <http://medstatistic.ru/calculators/calcodds.html> (accessed 12 February 2019).
16. Duan J, Wainwright M.S, Comeron J.M, Saitou N, Sanders A.R, Gelernter J, et al. Synonymous mutations in the human dopamine receptor D2 (DRD2) affect mRNA stability and synthesis of the receptor. Hum. Mol. Genet. 2003; 12:205–216.

Shao X.M, Spigelman I, Davies D.L, et al.  $\alpha$ 2 subunit-containing GABAA receptor subtypes are upregulated and contribute to alcohol-induced functional plasticity in the rat hippocampus. *Mol Pharmacol.* 2017; 92(2):101 – 112.

9. NCBI/dbSNP (2019). Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?term=Gabra2> (accessed 28 February 2019).

11. Edenberg H.J, Dick D.M, Xuei X, Tian

H, Almasy L, Bauer L.O. et al. Variations in GABRA2, encoding the alpha 2 subunit of the GABA(A) receptor, are associated with alcohol dependence and with brain oscillations. *Am J Hum Genet.* 2004; 74(4):705 – 14.

12. Shangareeva Z.A. Polymorphism of DNA loci of candidate genes for alcoholic liver disease: Dis. ... candidate of biol sciences. M. 2005 (in Russian).

13. Basharin V.A. Neuropeptides and

substrates of energy metabolism in the treatment of severe poisoning by depriving substances: Dis. ... Dr. med. sciences. S.P ; 2011 (in Russian).

14. Osechkina N.S., Nazarov G.V., Bonitenko E.Ju., Ivanov M.B., Kashuro V.A., Lapina N.V. et al. The expression's influence and polymorphism of genes, which encode gaba-receptors, on heft ethanol influence in laboratory rats. *Toxicological Review.* 2014; №6. C. 22– 27 (in Russian).

15. «Calculatr for odds ratio». Available at: <http://medstatistic.ru/calculators/cal-codds.html> (accessed 12 February 2019).

16. Duan J, Wainwright M.S, Comeron J.M, Saitou N, Sanders A.R, Gelernter J, et al. Synonymous mutations in the human dopamine receptor D2 (DRD2) affect mRNA stability and synthesis of the receptor. *Hum. Mol. Genet.* 2003; 12:205-216.

N.S. Osechkina<sup>1</sup>, G.V. Nazarov<sup>1</sup>, M.B. Ivanov<sup>2</sup>, E.G. Batotsyrenova<sup>2</sup>, V.A. Kashuro<sup>2</sup>, N.V. Lapina<sup>2</sup>, O.V. Varlamova<sup>1</sup>, I.S. Kravtsov<sup>1</sup>, A.V. Babkin<sup>2</sup>, A.S. Kraeva<sup>1</sup>, A.S. Melekhova<sup>2</sup>, K.O. Voitsekhovich<sup>2</sup>, D.S. Lisitski<sup>2</sup>

### EFFECT OF POLYMORPHISM OF THE GABRA2 GENE ON THE DEGREE OF RAT POISONING IN ACUTE ETHANOL INTOXICATION

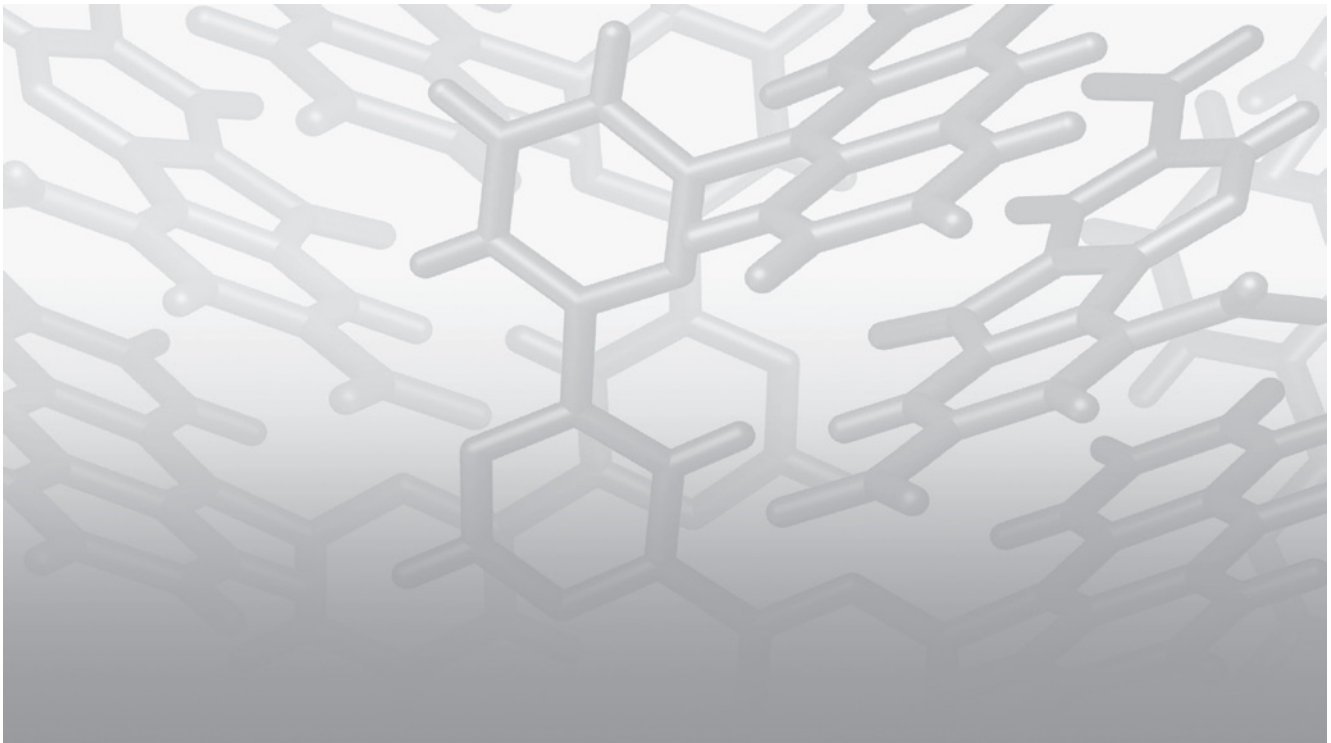
<sup>1</sup>Scientific Center «Signal», 107014, Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup>Institute of Toxicology, Federal Medical Biological Agency, 192019, Saint Petersburg, Russian Federation

Four polymorphic GABRA2 gene variations: rs105733011, rs8168342, rs198286814, rs198837638 that can influence the formation of different biological effects of the organism when exposed to ethanol have been investigated. For rs105733011 polymorphism the frequency of occurrence of the CT genotype was found to be significantly higher ( $p < 0,05$ ) among animals with «severe intoxication» – 37,0% than with «mild intoxication» – 14,0%. For rs198286814 polymorphism the tendency to the most frequent occurrence of the AG genotype in the group of animals with «severe intoxication» was established. Significant differences in the distribution of occurrence frequencies of the GG/AG genotypes in the studied groups for polymorphic loci rs8168342 and rs198837638 were not revealed. It was concluded that the rs105733011 polymorphism can be one of the genetic markers allowing to predict the degree of inhibitory action of ethanol in acute alcohol intoxication.

**Keywords:** intoxication, GABRA2 gene, genetic polymorphism, ethanol.

Материал поступил в редакцию 23.04.2019 г.



УДК 615.074 : 543.51 : 340.66

# УСТАНОВЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ТОКСИЧНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ В ВОЛОСАХ ПЕРВОЙ РУССКОЙ ЦАРИЦЫ АНАСТАСИИ РОМАНОВНЫ

Т.Д. Панова<sup>1</sup>, А.Ю. Дмитриев<sup>2</sup>, С.Б. Борзаков<sup>2,3</sup>,  
С.Г. Ленник<sup>4</sup>, Г.М. Кабилова<sup>4</sup>, А.Н. Быченко<sup>4</sup>,  
Д.А. Желтов<sup>4</sup>, М.А. Эдомская<sup>4</sup>, П.В. Ижевский<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение культуры «Государственный историко-культурный музей-заповедник «Московский Кремль» 103132, г. Москва, Российская Федерация

<sup>2</sup>ЛНФ Объединенный институт ядерных исследований, 141980, г. Дубна, Российская Федерация

<sup>3</sup>Государственный университет «Дубна», 141982, г. Дубна, Российская Федерация

<sup>4</sup>Республиканское государственное предприятие «Институт ядерной физики» Министерства энергетики Республики Казахстан, 050032, г. Алматы, Республика Казахстан

<sup>5</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России», 123098, г. Москва, Российская Федерация

**П**роведён элементный анализ фрагментов волос царицы Анастасии Романовны из некрополя Московского Кремля. Массовые доли элементов определены несколькими методами: нейтронного активационного анализа на трёх установках (реакторе ИБР-2, исследовательской установке ИРЕН, Объединённый институт ядерных исследований, Россия; и реакторе ВВР-К, Институт ядерной физики, Республика Казахстан), масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой и атомно-эмиссионной спектроскопии (Институт ядерной физики, Республика Казахстан). Результаты подтвердили гипотезу об отравлении ртутью первой русской царицы Анастасии Романовны.

**Ключевые слова:** элементный состав, волосы, средневековье, нейтронный активационный анализ, масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой и атомно-эмиссионной спектроскопии.

**Введение.** Перспективным направлением развития экологии и токсикологии является разработка мероприятий по коррекции химического дисбаланса при поступлении макро- и микроэлементов в организм, как одного из важнейших факторов профилактики заболеваний. При этом изучается элементный состав почв, воды или биосубстратов, полученных при обследовании отдельных групп населения и производственных

коллективов. Палеоэкология, наука, изучающая элементный состав останков человека и содержание токсических элементов в окружающей среде в сравнении с настоящим временем, позволяет получить «фоновые значения» их содержания в тканях человека.

Исследование микроэлементного состава останков и контекста захоронения, дает возможность многое узнать об обстоятельствах жизни

**Панова Татьяна Дмитриевна (Panova Tatiana Dmitrievna)**, доктор исторических наук, археолог, Федеральное государственное бюджетное учреждение культуры «Государственный историко-культурный музей-заповедник «Московский Кремль» [panova@kremlin.museum.ru](mailto:panova@kremlin.museum.ru)

**Дмитриев Андрей Юрьевич (Dmitriev Andrey Yurievich)**, кандидат физико-математических наук, начальник Группы нейтронного активационного анализа, Лаборатория нейтронной физики им. И.М. Франка, Объединённый институт ядерных исследований, [andmitriev@jinr.ru](mailto:andmitriev@jinr.ru)

**Борзаков Сергей Борисович (Borzakov Sergey Borisovich)**, кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник, Лаборатория нейтронной физики им. И.М. Франка, Объединённый институт ядерных исследований, Государственный университет «Дубна», [sbor@nf.jinr.ru](mailto:sbor@nf.jinr.ru)

**Ленник Светлана Геннадьевна (Lennik Svetlana Gennad'evna)**, кандидат физико-математических наук, заведующая Лабораторией ядерно-физических методов анализа, Институт ядерной физики Министерства энергетики Республики Казахстан, [svelta\\_sg@inbox.ru](mailto:svelta_sg@inbox.ru)

**Кабилова Гулинура Маликовна (Kabirova Gulinur Malikovna)**, старший научный сотрудник, Институт ядерной физики Министерства энергетики Республики Казахстан  
**Быченко Александр Николаевич (Bychenko Alexander Nikolaevich)**, начальник группы элементного анализа, Институт ядерной физики Министерства энергетики Республики Казахстан

**Желтов Дмитрий Анатольевич (Zhel'tov Dmitriy Anatol'evich)**, старший научный сотрудник, Институт ядерной физики Министерства энергетики Республики Казахстан

**Эдомская Мария Александровна (Edomskaya Mariya Alexandrovna)**, младший научный сотрудник, Институт ядерной физики Министерства энергетики Республики Казахстан

**Ижевский Павел Владимирович (Izhevskiy Pawel Vladimirovich)**, кандидат медицинских наук, доцент, Федеральное Государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр Российской Федерации Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна» Федерального медико-биологического агентства, [izhevski@rambler.ru](mailto:izhevski@rambler.ru)



и смерти человека. Поэтому проведение исследования элементного состава фрагментов волос из погребения первой жены царя Ивана Грозного – царицы Анастасии Романовны (скончалась в 1560 году), представляет интерес не только для историков, но и для экологов и токсикологов.

Целью проведённого исследования явилось установление содержания эссенциальных и токсичных химических элементов в волосах царицы Анастасии Романовны для проверки гипотезы о возможных причинах её гибели.

**Материалы и методы исследования.** Образец волос для изучения был передан в Лабораторию нейтронной физики (ЛНФ) им. И.М.Франка Объединённого института ядерных исследований (ОИЯИ) в феврале 2017 года. Имя исторической личности, из захоронения которой взят образец, было названо после завершения исследования.

Для определения массовых долей элементов применялся ряд методов: инструментальный нейтронный активационный анализ (ИНАА), масс-спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой (ИСП-МС), атомно-эмиссионная спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой (ИСП-АЭС). Общий для всех методов этап подготовки фрагментов волос царицы Анастасии Романовны проведен в ОИЯИ [1].

В ЛНФ ОИЯИ для облучения образцов использовались два источника нейтронов: установка ИРЕН [2] и импульсный реактор на быстрых нейтронах ИБР-2 [3, 4].

Установка ИРЕН работала в следующем режиме: максимальная энергия электронов 55 МэВ, средний ток 2,4 мкА. Поток тепловых нейтронов составил величину порядка  $\Phi_{th} = 6,0 \cdot 10^7$  н/(см<sup>2</sup> с), плотность потока резонансных нейтронов при 1 эВ равна  $\Phi_{res} = 7,6 \cdot 10^5$  н/(см<sup>2</sup> с).

Реактор ИБР-2 работал на средней мощности 2 МВт. Облучение проводилось на установке (описана в работе [4]) в течение 15 дней. Поток тепловых нейтронов был равен  $5,2 \cdot 10^{11}$  н/(см<sup>2</sup> с), резонансных –  $\Phi_{res} = 7,5 \cdot 10^{10}$  н/(см<sup>2</sup> с).

При облучении на реакторе ИБР-2 и установке ИРЕН использовались стандарты, изготовленные в NIST (США). Спектры измерялись HPGe детектором GC4018 фирмы Canberra с разрешением 1,78 кэВ для гамма-линии <sup>60</sup>Co с энергией 1332,5 кэВ. Обработка спектров проводилась с помощью программы GENIE-2000.

Учитывая уникальность образца и необходимость сравнения получаемых результатов, ИНАА образцов был выполнен в Институте ядерной физики Министерства энергетики Республики Казахстан (ИЯФ), на водо-водяном атомном реакторе ВВР-К [5].

При выполнении анализа элементного состава методом ИНАА трех биологических проб были подготовлены три навески каждого образца

массами около 100 мг. Навески были герметично упакованы в небольшие полиэтиленовые пакеты. Аналогичными образом были упакованы стандарты МАГАТЭ – образцы известного состава массой по 50 мг. Образцы со стандартами были завернуты в алюминиевую фольгу и облучены в периферийном вертикальном канале «10-б» реактора ВВР-К потоком нейтронов с плотностью  $\sim 2 \cdot 10^{13}$  н/(см<sup>2</sup> с) в течение двух часов.

Измерения наведенной активности облученных образцов проводились на гамма спектрометре с полупроводниковым детектором из высокочистого германия GX1520 Canberra (разрешение 1,73 кэВ по гамма-линии 1332,5 кэВ <sup>60</sup>Co). Для определения наведенной активности среднеживущих изотопов (то есть изотопов с периодами полураспада в интервале от нескольких часов до нескольких дней) регистрировались спектры облученных образцов через 5 – 7 дней после облучения в течении 1000 секунд на расстоянии 82 и 147 мм от окна детектора. Для определения активности долгоживущих изотопов регистрировались спектры облученных образцов через 21-28 дней после облучения в течение 1-3 часов на расстоянии 46 мм от окна детектора. Расчёт массовых долей элементов выполнен относительным методом с использованием паспортных данных элементного состава стандартных образцов. Статистическая обработка результатов (расчет средних значений концентраций, относительных погрешностей, доверительных интервалов) при вероятности 0,95 проводилась с использованием пакета анализа программы Excel.

Подготовку исследуемых образцов к анализу ИСП-МС и ИСП-АЭС осуществляли методом микроволнового кислотного разложения. Использовали микроволновую систему SpeedWave four (Berghof, Германия) с фторопластовыми автоклавами DAP-30+ при температуре +210°C. Навеска пробы 300,0 мг взвешивалась на аналитических весах METTLER TOLEDO AG 204 (с погрешностью измерений  $\pm 0,1$  мг), помещалась в автоклав с 5 см<sup>3</sup> концентрированной азотной кислоты. После разложения полученный выщелат переносили в мерную пробирку и доводили бидистиллированной водой до 10 см<sup>3</sup>. Каждая проба готовилась в двух параллелях. Перед анализом на ИСП-МС исходные растворы проб разбавлялись в соотношении 1:20, а на ИСП-АЭС в соотношении 1:10.

Для исследований использовались масс-спектрометр ELAN-9000 (Perkin Elmer SCIEX) и эмиссионный спектрометр OPTIMA 8000 (Perkin Elmer Inc). Градуировка спектрометров выполнялась по 5 точкам, включая инструментальный ноль. Достоверность линейной аппроксимации градуировочной характеристики не хуже 0,9995. Для уменьшения влияния матрицы на результаты анализа все градуировочные растворы гото-

вили из стандартных растворов PerkinElmer на основе холостой пробы, которую готовили одновременно с рабочими пробами.

Для матричной коррекции при выполнении исследований на ИСП-МС был выбран метод стандартной добавки к рабочей пробе. Добавку осуществляли перед разбавлением исходного раствора образца. Коррекцию измеренного значения массовой доли анализа  $\overline{X\overline{X}}$  в образце выполняли по формуле:

$$C = \overline{X}_{\text{проба без добавки}} \cdot \frac{D}{\overline{X}_{\text{проба с добавкой}} - \overline{X}_{\text{проба без добавки}}},$$

где:  $\overline{X\overline{X}}$  – среднеарифметический (по двум параллелям) результат измерения массовой доли анализа в образце, D – массовая доля добавки стандарта анализа. Результаты измерений представлены в виде:  $C \pm U$ , мкг/г, (достоверность  $P = 0,95$ ), где: U – расширенная неопределённость измерений.

**Результаты и обсуждение.** Результаты исследования волос царицы Анастасии Романовны представлены в таблице 1.

Как видно из таблицы 1, результаты анализа образцов волос царицы Анастасии, полученные различными методами в различных лабораториях, хорошо согласуются между собой. Установлено значительное количество тяжелых метал-

лов, особенно ртути и мышьяка в исследованных фрагментах волос.

Мышьяк и ртуть были основными ядами в период средневековья, как в Западной Европе, так и в России. Известно, что постепенное их поступление в организм вызывает отравление и гибель человека в течение сравнительно короткого периода времени. Выраженность и быстрота развития клинической картины отравления определяется интенсивностью воздействия и индивидуальными особенностями организма [6].

В таблице 2 результаты представлены в виде диапазона массовых долей элементов, определённых разными методами в волосах Анастасии Романовны, в сопоставлении с данными о содержании этих же элементов в волосах женщин в возрасте 20-50 лет проживавших в Московской области в 1997-2000 годах [7].

Как следует из таблицы 2, количество ртути в исследованных образцах волос значительно (в 500 раз!) превышает уровень у современных людей. Значительное превышение наблюдается также и по другим элементам (As, Ag). Известно, что мышьяк (As) длительное время задерживается в волосах, хотя основными органами накопления являются печень, почки, лёгкие и стенки ЖКТ [8]. Поскольку его количество в исследованных образцах волос также значительно превышает уровень у современных людей, то гипотеза об отравлении царицы не может быть отвергнута.

Таблица 1

**Элементный состав волос царицы Анастасии Романовны**

элемент	ИЯФ			ОИЯИ
	ИНАА	ИСП-МС	ИСП-АЭС	ИНАА
	мг/кг	мг/кг	мг/кг	мг/кг
Na	5900 ± 890	-	-	-
Mg	-	745 ± 45	715 ± 63	-
K	1150 ± 230	-	-	-
Ca	19000 ± 4800	-	-	-
Fe	275 ± 28	-	275 ± 18	< 1170
Ni	-	1,85 ± 0,33	4,25 ± 0,89	-
Cu	-	2570 ± 540	2930 ± 440	-
Zn	43,8 ± 4,4	53,7 ± 17	68,4 ± 15	< 100
Se	3,6 ± 1,1	2,07 ± 0,35	-	-
As	1,0 ± 0,1	1,24 ± 0,15	1,04 ± 0,32	1,18 ± 0,21
Br	15,6 ± 3,1	-	-	-
Sr	-	18,7 ± 1,9	20,9 ± 2,0	-
Ag	5850 ± 590	-	-	3460 ± 480
Sb	4,4 ± 1,3	3,93 ± 0,79	-	2,72 ± 0,44
Au	18,4 ± 1,8	-	-	6,4 ± 0,7
Hg	50,7 ± 5,1	32,8 ± 7,9	-	46,6 ± 1,2
Pb	-	4600 ± 460	4410 ± 400	-

Таблица 2

## Массовые доли элементов в волосах Анастасии Романовны и современных людей

Элемент	Волосы современных людей	Волосы Анастасии Романовны
Ag, мг/кг	0,191 ± 0,018	3460 – 5850
As, мг/кг	≤ 0,05	1,0 – 1,24
Au, мг/кг	0,0102 ± 0,0014	6,4 – 18,4
Bг, мг/кг	3,59 ± 0,26	15,6 ± 3,1
Ca, мг/кг	1318 ± 108	19000 ± 4800
Cu, мг/кг	9,02 ± 0,27	2570 – 2930
Fe, мг/кг	95,5 ± 7,5	275 ± 28
Hg, мг/кг	0,145 ± 0,009	32,8 – 50,7
Zn, мг/кг	165 ± 3	43,8 – 68,4

Молодая женщина (умерла в возрасте около 25 лет) не могла накопить такое количество вредного вещества, используя средневековые косметики и лекарства. Царица Анастасия стала женой молодого царя Ивана Васильевича в 1547 г., а скончалась 7 августа 1560 г. Простой пересчет показывает, что замуж ее выдали в возрасте 13-14 лет, что было обычным возрастом для невесты в брачной практике того периода. Молодая царица стала жертвой интриг придворной знати, пытавшейся удалить представителей рода Захарьиных-Кошкиных (предков Романовых) из царского окружения [9].

**Заключение.** В процессе изучения захоронений некрополя Вознесенского собора, существовавшего в Кремле до 1929 г., были проанализирова-

ны многие великокняжеские и царские останки из этой усыпальницы. Выявлены признаки, свидетельствующие о возможности как хронического, так и острого отравления представительниц правящих семей на русском престоле. В результате качественного анализа было установлено наличие ртути и мышьяка в исследованных фрагментах останков.

Проведенный нами, с использованием нескольких методов в аналитических центрах двух стран, количественный анализ элементного состава волос полностью подтверждает факт острого отравления первой русской царицы Анастасии, так как содержание ртути, мышьяка и других металлов в ее волосах оказалось чрезвычайно высоким.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/REFERENCES:

1. *Panova T.D., Dmitriev A.Yu., Borzakov S.B., Hramco S.* Analysis of arsenic and mercury content in human remains of the 16th and 17th centuries from Moscow Kremlin necropolises by neutron activation analysis at the IREN facility and the IBR-2 reactor FLNP JINR. *Physics of Particles and Nuclei Letters*. 2018; V. 15, I. 1: 127–134.
2. *Belikov O.V., Belozerozov A.V., Becher Yu., Bulycheva Yu., Fateev A.A., Galt A.A., Kayukov A.S., Krylov A.R., Kobetz V.V., Logachev P.V., Medvedko A.S., Meshkov I.N., Minashkin V.F., Pavlov V.M., Petrov V.A., Pyataev V.G., Rogov A.D., Sedyshev P.V., Shabratov V.G., Shvec V.A., Shvetsov V.N., Skrypnik A.V., Sumbayev A.P., Ufimtsev A.V., Zamrij V.N.* Physical start-up of the first stage of IREN facility. In Proceedings of International Seminar on Interaction of Neutrons with Nuclei ISINN-17, Dubna, 2018. <http://isinn.jinr.ru/proceedings/isinn-17/pdf/Shvetsov.pdf>
3. *Драгунов Ю.Г., Третьяков И.Т., Лопаткин А.В., Романова Н.В., Лукасевич И.Б., Ананьев В.Д., Виноградов А.В., Долгих А.В., Едунов Л.В., Пепельшев Ю.Н., Рогов А.Д., Шабалин Е.П., Заикин А.А., Головнин И.С.* Модернизация импульсного исследовательского реактора ИБР-Атомная энергия. 2012; Т. 1В. 1: 29-34.
4. *Dragunov Yu.G., Tret'yakov I.T., Lopatkin A.V., Romanova N.V., Lukasevich I.B., Anan'ev V.D., Vinogradov A.V., Dolgikh A.V., Edunov L.V., Pepelyshev Yu.N., Rogov A.D., Shabalin E.P., Zaikin A.A., Golovnin I.S.* Modernization of the IBR-2 pulsed research reactor. *Atomic energy*. 2012; V. 11. 1: 29-34 (in Russian).
5. *Шабалин Е.П., Верхоглядов Ф.У., Булавин М.В., Рогов Ф.Д., Кулагин Е.Н., Куликов С.А.* Спектр и плотность потока нейтронов в облучательном канале пучка №3 реактора ИБР-Письма в ЭЧАЯ. 2015; Т. 12, № 2 (193): 505-516.
6. *Shabalin E.P., Verkhoglyadov F.U., Bulavin M.V., Rogov F.D., Kulagin E.N., and Kulikov S.A.* Spectrum and density of neutron flux in the irradiation beam line no. 3 of the IBR-2 reactor. *Phys. Part. Nucl. Lett.* 2015; 12, 336.
7. Возобновление эксплуатации реактора ВВР-К. Сборник статей, Алматинское отделение Института атомной энергии Национального ядерного центра Республики Казахстан. Алматы; 1998.
8. Resumption of operation of the WWR-K reactor. Collection of articles, Almaty branch of the Institute of Atomic Energy of the National Nuclear Center of the Republic of Kazakhstan. Almaty; 1998 (in Russian).
9. *Бандман А.Л., Гудзовский Г.А., Дубейковская Л.С.* и др.; под ред. Филова В.А. и др. Вредные химические вещества. Неорганические соединения элементов I-IV групп: Справ. изд. Л: Химия, 1910. *Bandman A.L., Gudzovskiy G.A., Dubeykovskaya L.S.* at al.; ed. Filov V.A. at al. Harmful chemicals. Inorganic compounds of elements of I-IV groups: Reference book. Saint-Petersburg: Chemistry, 1988 (in Russian).
11. *Афтанас Л.И.* и др.; под ред. Скального А.В., Киселева М.Ф. Элементный статус населения России. Часть Элементный статус населения Центрального федерального округа. СПб.: Медкнига «ЭЛБИ-СПб»; 2011.
12. *Aftanas L.I.* at al.; ed. Skal'nyy A.V., Kiselev M.F. Elemental status of the population of Russia. Part Elemental status of the population of the Central Federal District. Saint-Petersburg: Medkniga «ELBI-SPb»; 2011 (in Russian).
13. 8 Баженов В.А., Булдаков Л.А., Василенко И.Я. и др.; под ред. Филова В.А. и др. Вредные химические вещества. Радиоактивные вещества. Справ. изд. Л: Химия; 1990.
14. *Bazhenov V.A., Buldakov L.A., Vasilenko I.Ya.* at al.; ed. Filov V.A. at al. Harmful chemicals. Radioactive substances. Reference book. Saint-Petersburg: Chemistry; 1990 (in Russian).
15. 9 Воронова Н.В., Панова Т.Д. Наветом и отравами царицу изведоша... Наука в России. 1998; № 3: 66-70.
16. *Voronova N.V. and Panova T.D.* Tsarina harassed by slanders and poisons... *Nauka Ross.* 1998; No. 3, 66–70 (in Russian).

*T.D. Panova<sup>1</sup>, A.Yu. Dmitriev<sup>2</sup>, S.B. Borzakov<sup>2,3</sup>, S.G. Lennik<sup>4</sup>, G.M. Kabirova<sup>4</sup>, A.N. Bychenko<sup>4</sup>,  
D.A. Zheltov<sup>4</sup>, M.A. Edomskaya<sup>4</sup>, P.V. Izhevskiy<sup>5</sup>*

***DETERMINATION OF TOXIC ELEMENTS' CONTENT IN THE HAIR  
OF THE FIRST RUSSIAN TSARINA ANASTASIA ROMANOVNA***

<sup>1</sup>The Moscow Kremlin State Historical and Cultural Museum and Heritage Site, 103132, Moscow, Kremlin, Russian Federation

<sup>2</sup>Frank Laboratory of Neutron Physics, Joint Institute for Nuclear Research, 141980, Dubna, Russian Federation

<sup>3</sup>Dubna State University, 141982, Dubna, Russian Federation

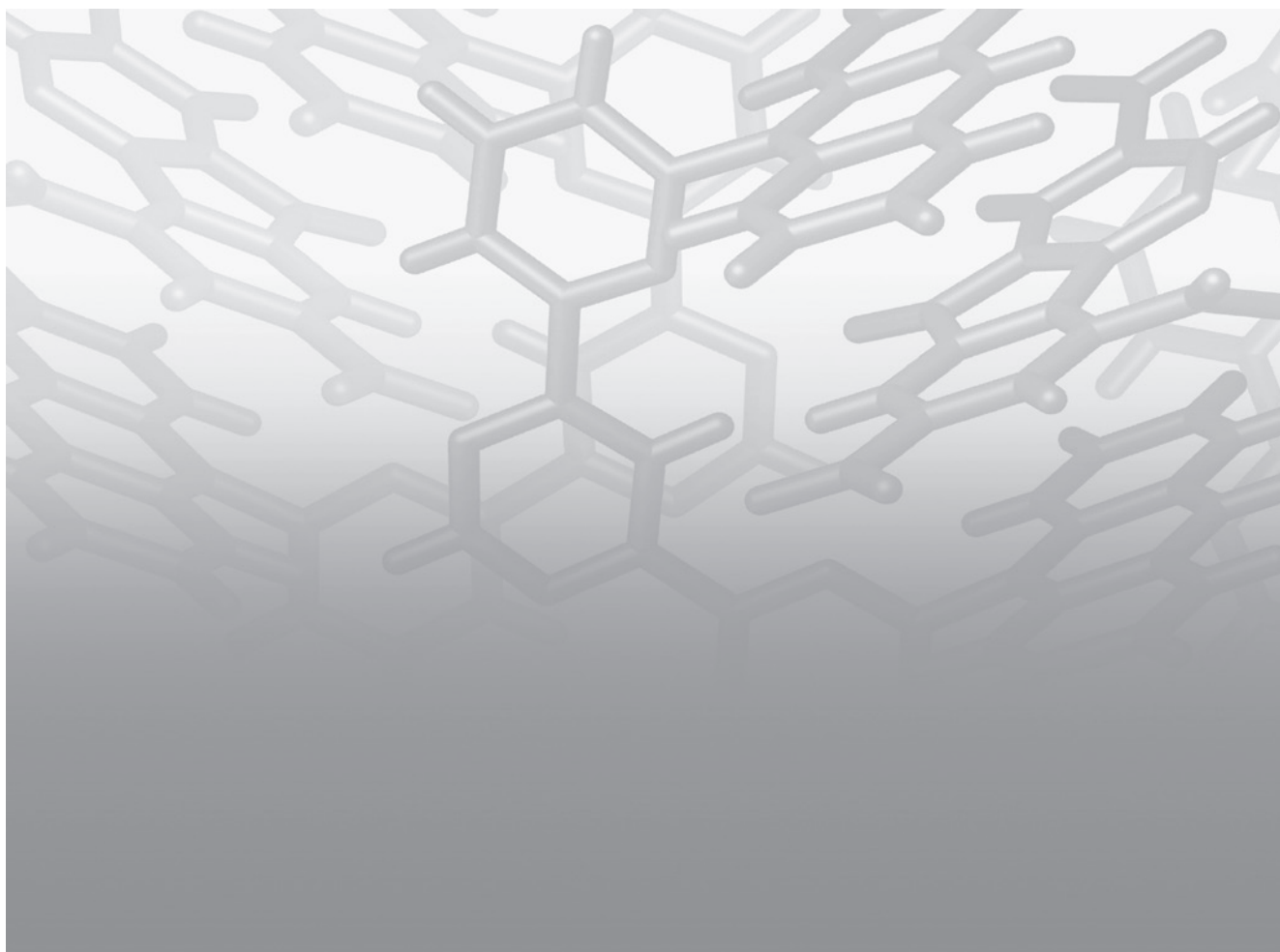
<sup>4</sup>Institute of Nuclear Physics, Ministry of Energy of the Republic of Kazakhstan, 050032, Almaty, Republic of Kazakhstan

<sup>5</sup>State Research Center - Burnasyan Federal Medical Biophysical Center, Federal Medical Biological Agency\_123098, Moscow, Russian Federation

An elemental analysis of the Tsarina Anastasia Romanovna hair fragments from the Moscow Kremlin necropolis has been carried out. The mass fractions of elements were determined by several methods: neutron activation analysis (using three facilities – the IBR-2 reactor, the IREN research facility, Joint Institute for Nuclear Research, Russia; and the WWR-K reactor, Institute of Nuclear Physics, Republic of Kazakhstan), inductively coupled plasma mass spectrometry, and atomic emission spectroscopy (Institute of Nuclear Physics, Republic of Kazakhstan). The results confirmed the hypothesis of mercury poisoning of the first Russian Tsarina Anastasia Romanovna.

**Keywords:** *elemental composition, hair, Middle Ages, neutron activation analysis, inductively coupled plasma mass spectrometry, atomic emission spectroscopy.*

Материал поступил в редакцию 23.04.2019 г.



УДК 615.28 : 546.171.1

# ИЗМЕНЕНИЯ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА КРОВИ И ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ МИЕЛОАБЛЯЦИОННОГО РЕЖИМА ПРИМЕНЕНИЯ ЦИКЛОФОСФАНА

Ю.Ю. Ивницкий<sup>1</sup>, Т.В. Шефер<sup>2</sup>,  
А.А. Тяптин<sup>2</sup>, В.Л. Рейнюк<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУН «Институт токсикологии» ФМБА России, 192019, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

<sup>2</sup>ФГБУ «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины» Министерства обороны Российской Федерации, 195043, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

При моделировании на крысах миелоабляционной цитостатической химиотерапии с применением циклофосфана наблюдалась фульминантная гипераммониемия, сопровождавшаяся увеличением содержания аммиака и глутамина, уменьшением содержания пировиноградной и молочной кислот в ткани головного мозга. Установлена положительная корреляция между показателями азотемии, с одной стороны, и содержанием в ткани мозга аммиака и глутамина, с другой. На фоне выполнения нагрузочной пробы с ацетатом аммония изменения химического состава крови и ткани головного мозга были более выраженными. Полученные данные свидетельствуют об интенсификации поступления в головной мозг из крови аммиака желудочно-кишечного происхождения, что ведёт к истощению тканевого пула пирувата при введении циклофосфана в дозах, применяемых с целью миелоабляции. Такие изменения создают условия для нарушения энергетического обеспечения неврологических функций при проведении миелоабляционной цитостатической химиотерапии с использованием циклофосфана.

**Ключевые слова:** циклофосфан, миелоабляционный режим, азотемия, головной мозг, аммиак, глутамин, пируват, лактат.

**Введение.** Циклофосфан (Ц) – оксазафосфоринное производное бис(β-хлорэтил)амин – применяется для лечения лимфом, лейкозов и некоторых солидных опухолей. Как правило, его суточная доза не превышает 50 мг/кг, отражая компромисс между эффективностью и переносимостью. Назначение циклофосфана и других цитостатиков в более высоких дозах, способных вызвать летальную панцитопению, именуют миелоабляционной цитостатической терапией [1] и сопровождают трансплантацией аллогенных стволовых кровяных клеток. Дозы Ц при миелоабляционной терапии на порядок превышают используемые при консервативных терапевтических режимах [2]. Минимальная миелоабляционная доза Ц составляет 120 мг/кг [3]. У крыс воздействие эквивалент-

ных доз Ц (≥600 мг/кг) проявлялось острыми неврологическими расстройствами: угнетением, тремором, утратой рефлексов и судорогами [4]. У людей сходный синдром (тремор, судороги, утрата сознания), наблюдался при в/в введении метил-бис(β-хлорэтил)амин в дозе 2,5 мг/кг [5].

Ввиду способности Ц в миелоабляционных дозах нарушать функции печени [6], почек [7], вызывать некроз клеток в криптах кишечного эпителия и геморрагический цистит [8], в формировании описанного неврологического синдрома могут вовлекаться не только метаболиты Ц, но и эндогенные токсичные вещества, содержащиеся в желудочно-кишечном химусе или моче. Некоторые из них, например аммиак, способны нарушать метаболизм головного мозга [9–12] и вызывать его отёк [11–13]. Прони-

Ивницкий Юрий Юрьевич (Ivniysky Jury Jurievich), доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник ФГБУН «Институт токсикологии» ФМБА России, neugierig@mail.ru

Шефер Тимур Васильевич (Schäfer Timur Vasilievich), доктор медицинских наук, начальник отдела ФГБУН «Институт токсикологии» ФМБА России; ФГБУ «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины» Министерства обороны Российской Федерации, tyartint@mail.ru

Тяптин Александр Андреевич (Tyartyn Alexander Andreevich), кандидат медицинских наук, научный сотрудник ФГБУ «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины» Министерства обороны Российской Федерации, tyartint@mail.ru;

Рейнюк Владимир Леонидович (Rejniuk Vladimir Leonidovich), доктор медицинских наук, заместитель директора по научной работе ФГБУН «Институт токсикологии» ФМБА России, vladton@mail.ru

цаемость гематоэнцефалического барьера для самого Ц незначительна [14, 15], в то время как аммиак легко проникает в ткань мозга из крови по градиенту концентрации его незаряженной молекулярной формы [16]. Это ставит вопрос о роли аммиака в формировании острых нейротоксических эффектов Ц.

Ранее, при введении Ц крысам в дозах  $\geq 600$  мг/кг, мы наблюдали фульминантную гипераммониемию [4], потенцируемую введением в желудок соли аммония [17], однако роль этого феномена в механизмах острой нейротоксичности Ц остаётся неизвестной. Её выяснение путём исследования химического состава крови и головного мозга при экспериментальном моделировании применения Ц в миелоабляционной дозе явилось *целью настоящего исследования*.

**Материалы и методы исследования.** Использовали самцов беспородных крыс-альбиносов массой 200–240 г, приобретённых в «Питомнике лабораторных животных „Рапполово“». Крыс случайным образом распределяли в группы по шесть голов и не кормили перед экспериментом в течение суток при неограниченном доступе к воде.

Гипераммониемию моделировали с помощью ацетата аммония (АА, х. ч., ЗАО «Вектон», Россия), который вводили однократно в желудок в виде водного раствора в дозе 12 ммоль/кг (0,35 ЛД<sub>50</sub>), в объёме 10 мл/кг. Это количество приблизительно на порядок превышает суммарное содержание аммиака и ионов аммония в желудочно-кишечном химусе крыс [18]. Официальный препарат Ц (АО «Биохимик») растворяли в воде *ex tempore* и вводили однократно внутривентриально (в/б) в дозе 600 мг/кг (2,1 ЛД<sub>50</sub>) в объёме 10 мл/кг, тотчас после АА.

Эта доза, с учётом соотношения массы и площади поверхности тела, эквивалентна минимальной миелоабляционной дозе для человека массой 60 кг: 120 мг/кг [19]. Контрольные животные вместо Ц получали изотонический раствор NaCl, а вместо АА – эквивалентное количество ацетата натрия.

Через 3 ч после введения АА и Ц крыс декапировали; для получения плазмы кровь немедленно гепаринизировали, центрифугировали при 7000 г в течение 5 мин. Для определения метаболитов ткани головного мозга голову крысы немедленно после декапитации погружали в сосуд с жидким азотом. Через 1 ч головной мозг извлекали и растирали в фарфоровой ступке с холодной 20 %-ной трихлоруксусной кислотой (2 мл раствора на 1 г мозговой ткани), центрифугировали при 7000 г в течение 20 мин. Супернатант фильтровали в воронке Шотта под вакуумом.

Аммиак в плазме крови и фильтрате тканей головного мозга определяли фотометрически с реактивом Несслера после перегонки по Конвею, глутамин – по аммиаку после кислотного гидролиза [20]. Лактат определяли фотометрически энзиматическим методом с использованием наборов реактивов ООО «Ольвекс Диагностикум», пируват – фотометрически 2,2-динитрофенолгидразиновым методом.

Для оценки влияния вводимых веществ на регистрируемые показатели использовали двухфакторный дисперсионный анализ. Межгрупповое сравнение средних величин выполняли с помощью критерия Тьюки, корреляционный анализ – методом Спирмена [21]. Уровень значимости  $\alpha$  приняли равным 0,05.

**Результаты и обсуждение.** Через 3 ч по-

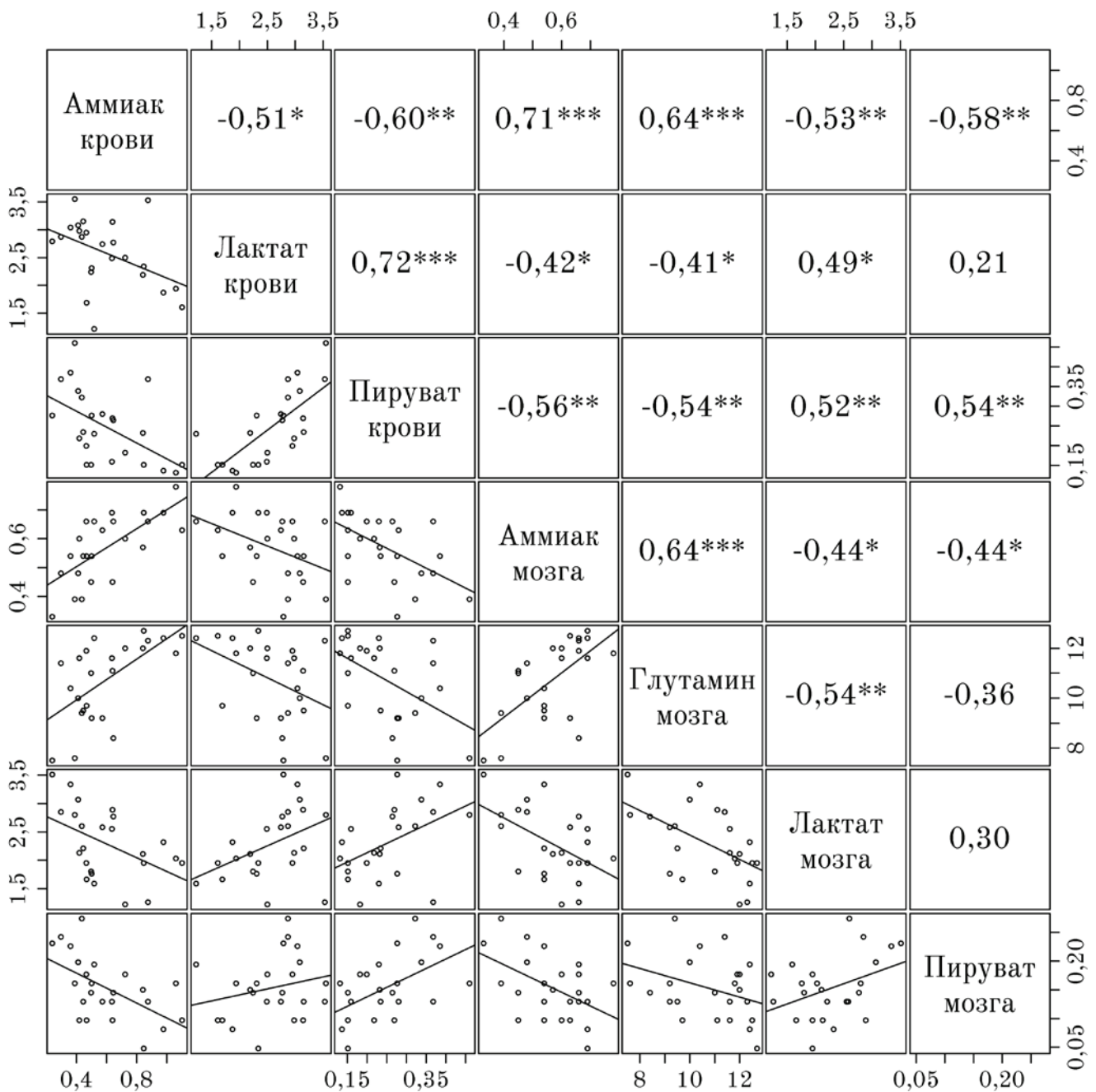
Таблица 1

**Содержание в плазме крови крыс аммиака, молочной и пировиноградной кислот ( $M \pm m$ ,  $n = 6$ ) через 3 ч после введения ацетата аммония и (или) циклофосфана**

Введённые вещества		Концентрация, мМ		
		аммиака	лактата	пирувата
Ацетат натрия#	NaCl (контроль)	0,322 ± 0,046	3,03 ± 0,11	0,358 ± 0,026
Ацетат натрия#	Циклофосфан##	0,483 ± 0,089*	2,33 ± 0,30*	0,240 ± 0,031*
Ацетат аммония#	NaCl	0,609 ± 0,130*	2,96 ± 0,07	0,244 ± 0,013*
Ацетат аммония#	Циклофосфан##	0,770 ± 0,107*†	1,99 ± 0,14*†	0,147 ± 0,004*†

Примечание: # – в/ж, 12 ммоль/кг; ## – в/б, 600 мг/кг; различие значимо,  $p < 0,05$ :

\* – с контролем; † – с животными, получившими только ацетат аммония



**Рис. 1.** Корреляционная матрица величин метаболических показателей крови и головного мозга крыс через 3 ч после введения ацетата аммония (в/ж, 12 ммоль/кг) и (или) циклофосфана (в/б, 600 мг/кг). Показатели перечислены по диагонали; снизу слева от неё – коррелограммы величин, выраженных в миллимолях на литр крови или на килограмм ткани головного мозга, по каждой оси абсцисс – показатель из соответствующего столбца, по каждой оси ординат – показатель из соответствующей строки; справа сверху – значения коэффициентов корреляции Спирмена  $r$ . Величина  $r$  значимо отличается от нуля: \* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,01$ , \*\*\* –  $p < 0,001$ .

сле введения Ц или АА содержание аммиака в плазме крови возрастало в 1,9 и 1,5 раза, соответственно, а после их сочетанного введения – 2,4-кратно. Содержание пирувата в крови после изолированного введения АА или Ц было

в 1,5 раза меньшим, а после их сочетанного введения – в 2,4 раза меньшим, чем у интактных крыс. Содержание лактата в крови снижалось в меньшей мере; отношение возрастало в 1,6 раза (табл. 1).

Таблица 2

**Содержание в головном мозгу крыс аммиака, глутамина, молочной и пировиноградной кислот (M ± m, n = 6) через 3 ч после введения ацетата аммония и (или) циклофосфана**

Введённые вещества аммиака		Концентрация, мМ			
		глутамина	лактата	пирувата	
Ацетат натрия <sup>#</sup>	NaCl (контроль)	0,44 ± 0,03	9,4 ± 0,6	3,03 ± 0,14	0,222 ± 0,016
Ацетат натрия <sup>#</sup>	Циклофосфан <sup>##</sup>	0,58 ± 0,03*	11,6 ± 0,4*	1,62 ± 0,14*	0,159 ± 0,010*
Ацетат аммония <sup>#</sup>	NaCl	0,59 ± 0,03*	10,3 ± 0,6	2,42 ± 0,15*	0,129 ± 0,012*
Ацетат аммония <sup>#</sup>	Циклофосфан <sup>##</sup>	0,67 ± 0,03*	11,8 ± 0,4*	2,08 ± 0,13*	0,102 ± 0,016*†

Примечание: # – в/ж, 12 ммоль/кг; ## – в/б, 600 мг/кг; различие значимо, p < 0,05; \* – с контролем; † – с животными, получившими только ацетат аммония

Похожие изменения выявлены и в ткани головного мозга: под влиянием Ц, АА или обоих токсикантов содержание лактата снижалось в 1,9; 1,3 и 1,5 раза, пирувата – в 1,4; 1,7 и 2,2 раза, соответственно (табл. 2). Отношение в ткани головного мозга крыс, получивших Ц и АА, возросло в 1,7 раза по сравнению с таковым у интактных животных. В мозгу крыс, получивших только АА, был повышен уровень аммиака, но не глутамина. При изолированном применении Ц и на фоне нагрузки солью аммония возрастало содержания как аммиака (в 1,3 и 1,5 раза), так и глутамина (в 1,2 и 1,3 раза, соответственно, табл. 2).

Азотемия положительно коррелировала с содержанием аммиака или глутамина в ткани головного мозга. Содержание аммиака или глутамина в крови или ткани мозга отрицательно коррелировало с содержанием в них пирувата или лактата (рис. 1).

Таким образом, моделирование миелобляционного режима применения Ц сопровождалось гипераммониемией, накоплением аммиака и глутамина в ткани головного мозга, уменьшением содержания в плазме крови и ткани головного мозга лактата и пирувата; на фоне нагрузки АА эти изменения усугублялись (табл. 1 и 2).

Возможны 4 механизма снижения уровня пировиноградной кислоты в ткани мозга [22]: интенсификация (1) пируватдегидрогеназной реакции с образованием ацетил-КоА, (2) обратённой лактатдегидрогеназной реакции, (3) карбоксилирования пирувата с образованием оксалоацетата и (4) аминирования пирувата

с образованием аланина. Первый вариант затруднён при избытке ацетил-КоА, характерном для отравления солями аммония [23]; второй можно было бы принять, исходя из повышения отношения, но ему противоречит убыль лактата. Более вероятны третий и четвёртый варианты: убыль пирувата вследствие интенсификации поступления аммиака в нервную ткань. Карбоксилирование пирувата стимулируется низкой концентрацией оксалоацетата, связанной с уровнем кетоглутарата; избыток аммиака в крови и тканях (табл. 1 и 2) ведёт к аминированию именно этих кетокислот, истощая пул интермедиатов цикла Кребса [22]. Нельзя исключить и непосредственное аминирование пирувата при участии аланинаминотрансферазы с образованием аланина [24]. В пользу субстратной активации аммиаком аминирования кетокислот [25], в частности, пировиноградной, говорит повышение отношения, указывающее на восстановление пула пиридиновых нуклеотидов, что способствует восстановительному аминированию. Это подтверждается и тем, что в крови и головном мозгу крыс через 3 ч после введения АА и (или) Ц уровни аммиака и глутамина, с одной стороны, и молочной и пировиноградной кислот, с другой, изменялись дискордантно (рис. 1). Так как от уровня аммонийного иона могут зависеть уровни глутамина, пирувата и, через пируват, лактата, но не наоборот, вероятной непосредственной причиной таких изменений была гипераммониемия.

Снижение доступности пирувата усугубляет энергетический дефицит нервной ткани, вы-



зывается прямым действием алкилирующих соединений на окислительный ресинтез АТФ [26]. Возможны и другие механизмы нарушения энергетического обмена аммиаком – истощение НАД<sup>+</sup> при гиперактивации поли-АДФ-рибозилирования [10], транзиторное повышение проницаемости митохондриальных мембран [11], образование комплексных соединений с атомами железа и меди в активных центрах оксидоредуктаз [27], ингибирование α-кетоглутаратдегидрогеназы и малат-аспартатного шунта [28], интенсификация гидролиза АТФ, окисления НАДФ-Н<sub>2</sub> [13], истощение пула интермедиатов цикла Кребса [29], связывание Mg<sup>2+</sup> в трипельфосфат [12], повреждение клеток вследствие гиперактивации NMDA-рецепторов [10]. Через эти механизмы гипераммониемия может быть вовлечена в формирование не только нейротоксических, но и других резорбтивных эффектов Ц. На это указывает более ранняя гибель крыс, получавших Ц в дозе 200 мг/кг, не вызывавшей неврологических расстройств, на фоне в/ж введения АА [30].

**Заключение.** Введение крысам Ц в дозе 600 мг/кг, позволявшей моделировать миелоабляционный режим его применения, сопровождалось накоплением аммиака и глутамина в крови и в ткани головного мозга при одновременном снижении содержания пировиноградной и молочной кислот, увеличении отношения содержания лактата и пирувата. Накопление аммиака в ткани мозга было меньшим, чем в плазме крови, и усугублялось на фоне введения в желудок АА. Такие изменения указывают на интенсификацию поступления в головной мозг из крови аммиака желудочно-кишечного происхождения как на причину истощения тканевого пула пирувата, в ткани головного мозга. Полученные данные показывают, что профилактика фульминантной гипераммониемии является одной из проблем при использовании Ц с целью подготовки пациентов к пересадке стволовых кроветворных клеток.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Kharfan-Dabaja M.A., Reljic T., El-Asmar J., Nishihori T., Ayala E., Hamadani M. et al. Reduced-intensity or myeloablative allogeneic hematopoietic cell transplantation for mantle cell lymphoma: a systematic review. *Future oncol.* 2016; 22 (12): 2631-42.
- Haioun C., Lepage E., Gisselbrecht C., Salles G., Coiffier B., Brice P. et al. Survival benefit of high-dose therapy in poor-risk aggressive non-Hodgkin's lymphoma: final analysis d'Etude des lymphomes de l'Adulte study. *J. Clin. Oncol.* 2000; 18: 3025-30.
- Atilla E., Atilla P.A., Demir T. A review of myeloablative vs reduced intensity/non-myeloablative regimens in allogeneic hematopoietic stem cell transplantations. *Balkan Med J.* 2017, 34 (1): 1-9.
- Schäfer T.V., Ivnitsky J.J., Rejniuk V.L. Cyclophosphamide-induced leakage of gastrointestinal ammonia into the common bloodstream in rats. *Drug Chem. Toxicol.* 2011; 34: 25-31.
- Clifford P., Bhardwaj B.V., Whittaker L.R. Intensive nitrogen mustard therapy with abdominal aortic occlusion in nasopharyngeal carcinoma. *Brit. J. Cancer.* 1965; 19: 51-71.
- Fraiser L.H., Kanekai S., Kehrer J.P. Cyclophosphamide toxicity. Characterizing and avoiding the problem. *Drugs.* 1991; 42: 781-95.
- Sayed-Ahmed M. Progression of cyclophosphamide-induced acute renal metabolic damage in carnitine-depleted rat model. *Clin. Exp. Nephrol.* 2010; 14 (5): 418-26.
- Ekena J., Wood E., Manchester A., Chun R., Trepanier L.A. Glutathione-S-transferase-theta genotypes and the risk of cyclophosphamide toxicity in dogs. *Vet Comp Oncol.* 2018; 16(4): 529-34.
- Dasarathy S., Mookerjee R.P., Rackayova V., Rangroo Thrane V., Vairappan B., Ott P. et al. Ammonia toxicity: from head to toe? *Metab Brain Dis.* 2017 Apr; 32(2): 529-38.
- Косенко Е.А., Каминский Ю.Г. Клеточные механизмы токсичности аммиака. М.: Изд-во ЛКИ; 2008.
- Norenberg M.D., Rama Rao K.V., Jayakumar A.R. Ammonia neurotoxicity and the mitochondrial permeability transition. *J. Bioenerg. Biomembr.* 2004; 36: 303-7.
- Козлов Н.Б. Аммиак, его обмен и роль в патологии. М.: Медицина; 1971.
- Зайчик А.Ш., Чурилов Л.П. Основы патохимии. СПб.: ЭлбисПб; 2000.
- Unger C., Eibl H., von Heyden H.W., Krisch B., Nagel G.A. Blut-Hirn-Schranke und das Eindringen von Zytostatika. *Klin. Wochenschr.* 1985; 63 (12): 565-71.
- Orbach D., Brisse H., Doz F. Central neurological manifestations during chemotherapy in children. *Arch. Pediatr.* 2003; 10 (6): 533-9.
- Cooper A. J. L., Plum F. Biochemistry and physiology of brain ammonia. *Physiol. Rev.* 1987; 67: 440-519.
- Ivnitsky J.J., Schäfer T.V., Rejniuk V.L. Promotion of the toxic action of cyclophosphamide by digestive tract luminal ammonia in rats. *ISRN Toxicology.* 2011; (Article ID 450875). Available at: <http://www.hindawi.com/isrn/toxicology/2011/450875>.
- Kim K., Lee W., Benevenga N.J. Feeding diets containing high levels of milk products or cellulose decrease urease activity and ammonia production in rat intestine. *J. Nutr.* 1998; 128: 1186-91.
- Хабриев П.У., ред. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. 2-е изд. М.: Медицина, 2005.
- Whitehead T.P., Whittaker S.R.F. A method for the determination of glutamine in cerebrospinal fluid and the results in hepatic coma. *J. Clin. Pathol.* 1955; 8: 81-4.
- R: A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. 2017. Available at: <http://www.r-project.org/>.
- Дэгли С., Никольсон Д. Метаболические пути. М.: Мир; 1973.
- Edson N.L. Ketogenesis – antiketogenesis. 1. The influence of ammonium chloride on ketone-body formation in liver. *Biochem. J.* 1935; 29 (9): 2082-94.
- Dadsetan S., Kukulj E., Bak L.K., Sørensen M., Ott P., Vilstrup H. et al. Brain alanine formation as an ammonia-scavenging pathway during hyperammonemia: effects of glutamine synthetase inhibition in rats and astrocyte-neuron co-cultures. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2013; 33 (8): 1235-41.
- Dadsetan S. Inhibition of glutamine synthesis induces glutamate dehydrogenase-dependent ammonia fixation into alanine in co-cultures of astrocytes and neurons. *Neurochem. Int.* 2011; 59 (4): 482-8.
- Хурцилава О.Г., ред., Плужников Н.Н., ред., Накатис Я.А., ред. Оксидативный стресс и воспаление: патогенетическое партнерство. СПб.: Изд-во СПбГУ им. И. И. Мечникова; 2012.
- Зеленин К.Н., Алексеев В.В. Химия общая и биоорганическая. СПб.: Элбис-СПб; 2003.
- Lai J.S., Cooper A.J. Neurotoxicity of ammonia and fatty acids: differential inhibition of mitochondrial dehydrogenases by ammonia and fatty acyl coenzyme A derivatives. *Neurochem. Res.* 1991; 16 (7): 795-803.
- Ott P., Clemmesen O., Larssen F.S. Cerebral metabolic disturbances in the brain during acute liver failure: From hyperammonemia to energy failure and proteolysis. *Neurochem. Int.* 2005; 47 (1-2): 13-8.
- Шефер Т.В., Рейнюк В.Л., Малаховский В.Н., Ивницкий Ю.Ю. Роль люминального пула аммиака пищеварительного тракта в реализации токсического действия циклофосфана на крыс. *medline.ru.* 2010; 11. Available at: <http://www.medline.ru/public/art/tom11/art44.html>.
- Clifford P., Bhardwaj B.V., Whittaker L.R. Intensive nitrogen mustard therapy with abdominal aortic occlusion in nasopharyngeal carcinoma. *Brit. J. Cancer.* 1965; 19: 51-71.
- Fraiser L.H., Kanekai S., Kehrer J.P. Cyclophosphamide toxicity. Characterizing

## REFERENCES:

- Kharfan-Dabaja M.A., Reljic T., El-Asmar J., Nishihori T., Ayala E., Hamadani M. et al. Reduced-intensity or myeloablative allogeneic hematopoietic cell transplantation for mantle cell lymphoma: a systematic review. *Future oncol.* 2016; 22 (12): 2631-42.
- Haioun C., Lepage E., Gisselbrecht C., Salles G., Coiffier B., Brice P. et al. Survival benefit of high-dose therapy in poor-risk aggressive non-Hodgkin's lymphoma: final analysis d'Etude des lymphomes de l'Adulte study. *J. Clin. Oncol.* 2000; 18: 3025-30.
- Atilla E., Atilla P.A., Demir T. A review of myeloablative vs reduced intensity/non-myeloablative regimens in allogeneic hematopoietic stem cell transplantations. *Balkan Med J.* 2017, 34 (1): 1-9.
- Schäfer T.V., Ivnitsky J.J., Rejniuk V.L. Cyclophosphamide-induced leakage of gastrointestinal ammonia into the common bloodstream in rats. *Drug Chem. Toxicol.* 2011; 34: 25-31.
- Clifford P., Bhardwaj B.V., Whittaker L.R. Intensive nitrogen mustard therapy with abdominal aortic occlusion in nasopharyngeal carcinoma. *Brit. J. Cancer.* 1965; 19: 51-71.
- Fraiser L.H., Kanekai S., Kehrer J.P. Cyclophosphamide toxicity. Characterizing

- and avoiding the problem. *Drugs*. 1991; 42: 781-95.
7. Sayed-Ahmed M. Progression of cyclophosphamide-induced acute renal metabolic damage in carnitine-depleted rat model. *Clin. Exp. Nephrology*. 2010; 14 (5): 418-26.
  8. Ekena J., Wood E., Manchester A., Chun R., Trepanier L.A. Glutathione-S-transferase-theta genotypes and the risk of cyclophosphamide toxicity in dogs. *Vet Comp Oncol*. 2018; 16(4): 529-34.
  9. Dasarathy S., Mookerjee R.P., Rackayova V., Rangroo Thrane V., Vairappan B., Ott P. et al. Ammonia toxicity: from head to toe? *Metab Brain Dis*. 2017 Apr; 32(2): 529-38.
  10. Kosenko E.A., Kaminskiy Yu.G. Cellular mechanisms of toxicity of ammonia. Moscow.: Izd-vo LKI; 2008 (in Russian).
  11. Norenberg M.D., Rama Rao K.V., Jayakumar A.R. Ammonia neurotoxicity and the mitochondrial permeability transition. *J. Bioenerg. Biomembr*. 2004; 36: 303-7.
  12. Kozlov N.B. Ammonia, its metabolism and role in disease. Moscow.: Meditsina; 1971 (in Russian).
  13. Zaychik A.Sh., Churilov L.P. Fundamentals of pathochemistry. Saint-Petersburg.: Elbi-SPb; 2000 (in Russian).
  14. Unger C., Eibl H., von Heyden H.W., Krisch B., Nagel G.A. Blut-Him-Schranke und das Eindringen von Zytostatika. *Klin. Wochenschr*. 1985; 63 (12): 565-71.
  15. Orbach D., Brisse H., Doz F. Central neurological manifestations during chemotherapy in children. *Arch. Pediatr*. 2003; 10 (6): 533-9.
  16. Cooper A.J.L., Plum F. Biochemistry and physiology of brain ammonia. *Physiol. Rev*. 1987; 67: 440-519.
  17. Ivnitsky J.J., Schäfer T.V., Rejniuk V.L. Promotion of the toxic action of cyclophosphamide by digestive tract luminal ammonia in rats. *ISRN Toxicology*. 2011; (Article ID 450875). Available at: <http://www.hindawi.com/isrn/toxicology/2011/450875>.
  18. Kim K., Lee W., Benevenga N.J. Feeding diets containing high levels of milk products or cellulose decrease urease activity and ammonia production in rat intestine. *J. Nutr*. 1998; 128: 1186-91.
  19. Khabriev R.U., ed. Manual on experimental (preclinical) study of new pharmacological substances. 2nd ed. Moscow.: Meditsina; 2005 (in Russian).
  20. Whitehead T.P., Whittaker S.R.F. A method for the determination of glutamine in cerebrospinal fluid and the results in hepatic coma. *J. Clin. Pathol*. 1955; 8: 81-4.
  21. R: A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. 2017. Available at: <http://www.r-project.org/>.
  22. Dagley S., Nicholson D.E. An introduction to metabolic pathways. Oxford, Edinburg: Blackwell Scientific Publications; 1970.
  23. Edson N.L. Ketogenesis – antiketogenesis. 1. The influence of ammonium chloride on ketone-body formation in liver. *Biochem. J*. 1935; 29 (9): 2082-94.
  24. Dadsetan S., Kukoji E., Bak L.K., Sørensen M., Ott P., Vilstrup H. et al. Brain alanine formation as an ammonia-scavenging pathway during hyperammonemia: effects of glutamine synthetase inhibition in rats and astrocyte-neuron co-cultures. *J. Cereb. Blood Flow Metab*. 2013; 33 (8): 1235-41.
  25. Dadsetan S. Inhibition of glutamine synthesis induces glutamate dehydrogenase-dependent ammonia fixation into alanine in co-cultures of astrocytes and neurons. *Neurochem. Int*. 2011; 59 (4): 482-8.
  26. Khurtsilava O.G., ed., Pluzhnikov N.N., ed., Nakatis Ya.A., ed. Oxidative stress and inflammation: a pathogenetic partnership. Saint-Petersburg.: IZD-VO SPBGU im. I. I. Mechnikova; 2012 (in Russian).
  27. Zelenin K.N., Alekseev V.V. A general and bioorganic chemistry. Saint-Petersburg.: Elbi-SPb; 2003 (in Russian).
  28. Lai J.S., Cooper A.J. Neurotoxicity of ammonia and fatty acids: differential inhibition of mitochondrial dehydrogenases by ammonia and fatty acyl coenzyme A derivatives. *Neurochem. Res*. 1991; 16 (7): 795-803.
  29. Ott P., Clemmesen O., Larssen F.S. Cerebral metabolic disturbances in the brain during acute liver failure: From hyperammonemia to energy failure and proteolysis. *Neurochem. Int*. 2005; 47 (1-2): 13-8.
  30. Schäfer T.V., Rejniuk V.L., Malakhovskiy V.N., Ivnitsky J.J. The role of the digestive tract luminal ammonia pool in cyclophosphamide toxicity in rat. *medline.ru*. 2010; 11. Available at: <http://www.medline.ru/public/art/tom11/art44.html> (Accessed 5 March 2019, in Russian).

Yu.Yu. Ivnitsky<sup>1</sup>, T.V. Schäfer<sup>2</sup>, A.A. Tyaptin<sup>2</sup>, V.L. Rejniuk<sup>1</sup>

## CHANGES IN THE CHEMICAL COMPOSITION OF BLOOD AND BRAIN OF RATS UNDER THE CONDITIONS OF MODELING OF THE MYELOABLATION REGIMEN OF CYCLOPHOSPHAMIDE ADMINISTRATION

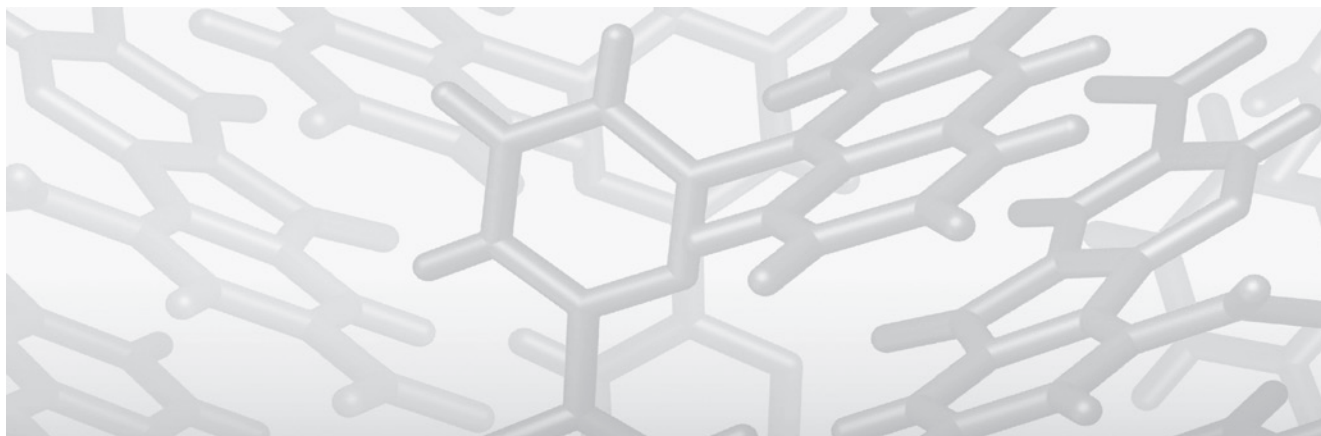
<sup>1</sup>Institute of Toxicology, Federal Medical Biological Agency, 192019, Saint Petersburg, Russian Federation

<sup>2</sup>State Scientific Research Test Institute of the Military Medicine, Ministry of Defense of the Russian Federation, 195043, Saint Petersburg, Russian Federation

When modeling myeloablation cytostatic chemotherapy with cyclophosphamide in rats fulminant hyperammonemia was observed accompanied by an increase in the content of ammonia and glutamine, a decrease in the content of pyruvic and lactic acids in brain tissue. A positive correlation between the indicators of azotemia and the content of ammonia and glutamine in brain tissue was established. In loading test with ammonium acetate changes in the chemical composition of blood and brain tissue were more pronounced. The data obtained indicate the intensification of the intake of gastrointestinal ammonia into the brain from the blood, which leads to the depletion of the tissue pool of pyruvate with the introduction of cyclophosphane in doses used for myeloablation. Such changes create the conditions for disruption of energy supply of neurological functions during myeloablative cytotoxic chemotherapy using cyclophosphamide.

**Keywords:** cyclophosphamide, myeloablation regime, azotemia, brain, ammonia, glutamine, pyruvate, lactate.

Материал поступил в редакцию 23.04.2019 г.



УДК 547.7 : 615.099 : 616-006

# ВЛИЯНИЕ АГОНИСТОВ АРИЛГИДРОКАРБОНОВОГО РЕЦЕПТОРА И ЛИПОПОЛИСАХАРИДА НА МАРКЕРЫ ГЕНОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ БЕНЗ(А)ПИРЕНА

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

*ФГУП НИИ гигиены,  
профпатологии и экологии  
человека ФМБА России,  
г. Санкт-Петербург, Российская  
Федерация*

Оценивали влияние агонистов арилгидрокарбонového рецептора (FICZ и ITE), а также липополисахарида при токсическом действии бенз(а)пирена в клетках гепатомы человека линии HeraRG. В качестве маркеров генотоксического действия бенз(а)пирена определяли активные формы белков ключевых стресс-активируемых киназных каскадов и системы репарации ДНК. Липополисахарид в смеси с бенз(а)пиреном усиливает токсичность бенз(а)пирена и снижает активацию белков системы репарации ДНК ниже контрольного уровня. Агонисты арилгидрокарбонového рецептора (FICZ и ITE) проявляют цитопротекторное действие на фоне токсичности бенз(а)пирена, усиливают активацию киназы Akt1 и снижают уровень активации белка p53 и чекпойнт-киназ Chk1 и Chk2. Таким образом, FICZ и ITE снижают генотоксичность бенз(а)пирена.

**Ключевые слова:** полиароматические углеводороды, бенз(а)пирен, арилгидрокарбонový рецептор, HeraRG, NF-κappaB, генотоксичность.

**Введение.** Генотоксический тип канцерогенеза связан с образованием в ходе метаболизма ксенобиотиков высокорекреационных метаболитов, способных вызывать окислительный стресс, образование аддуктов с ДНК и белками и вызывать повреждения ДНК [1]. Ключевую роль в этом процессе играют цитохромы P450, вызывающие окислительное гидроксирование ксенобиотиков [2]. Бенз(а)пирен (далее БП) и 3-метилхолантрен являются наиболее изученными из полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) и часто используются как модельные соединения в экспериментальной онкологии. В экспериментах на животных было показано, что аппликация спиртового раствора БП на кожу вызывает развитие опухоли в течение 90-100 сут, внутримышечная инъекция – быстрое развитие саркомы [3].

Повреждения ДНК восстанавливаются с помощью системы внутриклеточной репарации. В детекцию повреждений ДНК и их репарацию вовлечен ряд белков, наиболее широко класси-

фицируемых как сенсоры, медиаторы, трансдюсеры и эффекторы [4]. Сенсорные белки, такие как Rad9, Rad1, Hus1, аккумулируются на участке повреждения ДНК, способствуя фосфорилированию белков чекпойнт-киназ, и влияют на белки-трансдюсеры ATM и ATR. Активация медиаторов, таких как H2AX, BRCA1, SMC1 приводит к формированию устойчивого мультибелкового комплекса на участке повреждения ДНК, дополнительно активируя ATM сигналинг и чекпойнт-киназы. Киназы контроля клеточного цикла Chk1 и Chk2 важны для остановки клеточного цикла перед митозом в ответ на повреждение ДНК. К эффекторным молекулам относятся белки p53 и MDM2. Белок p53 играет ключевую роль в определении судьбы клетки после стресса различного типа (радиоактивное или химическое повреждение ДНК, гипоксия, активация онкогенов) – остановка клеточного цикла или гибель клетки. Определение уровня экспрессии и функционального состояния белков, вовлечен-

**Бабаков Владимир Николаевич (Babakov Vladimir Nikolaevich)**, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник ФГУП НИИ ГПЭЧ ФМБА России, babakov@nihophe.ru

**Роговская Надежда Юрьевна (Rogovskaya Nadezhda Yurievna)**, научный сотрудник ФГУП НИИ ГПЭЧ ФМБА России

**Курдюков Иван Дмитриевич (Kurdyukov Ivan Dmitrievich)**, старший научный сотрудник ФГУП НИИ ГПЭЧ ФМБА России

**Бельтюков Петр Петрович (Beltyukov Petr Petrovich)**, кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией молекулярной токсикологии и экспериментальной терапии ФГУП НИИ ГПЭЧ ФМБА России

**Дулов Сергей Анатольевич (Dulov Sergei Anatolievich)**, кандидат медицинских наук, заместитель заведующего отделом токсикологии ФГУП НИИ ГПЭЧ ФМБА России

**Радиллов Андрей Станиславович (Radilov Andrei Stanislavovich)**, доктор медицинских наук, профессор, и.о. директора ФГУП НИИ ГПЭЧ ФМБА России, radilov@nihophe.ru

ных во все элементы репарационного процесса после генотоксического действия, позволяет быстро определять соединения, обладающие генотоксическим действием, а также оценивать влияние на генотоксическое действие потенциальных протекторных соединений.

Ранее нами было продемонстрировано цитопротекторное влияние агониста арилгидрокарбонового рецептора FICZ в ответ на токсическое действие БП в клетках гепатомы человека линии HepaRG и возможное участие в этом влиянии транскрипционного фактора NF-κB [5].

Основной целью настоящей работы было оценить влияние нетоксичных высокоаффинных эндогенных агонистов арилгидрокарбонового рецептора (AhR) 5,11-дигидроиндоло[3,2-b]карбазол-6-карбоксальдегида (FICZ,  $K_d=70$  пМ) и метилового эфира 2-(1H-индол-3-илкарбонил)-4-тиазолекарбоксильной кислоты (ITE,  $K_d=3$  нМ), а также активатора транскрипционного фактора NF-κB – липополисахарида из *S. typhosa* (ЛПС) на внутриклеточные маркеры генотоксического действия БП в клетках линии HepaRG.

**Материалы и методы исследования.** Клетки линии HepaRG (Gibco) культивировали во флаконах в среде Вильямса E (Gibco) с добавлением 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота, средовых добавок инсулина и гидрокортизона, антибиотиков стрептомицина-пенициллина при 37 °C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. FICZ и ITE были получены из Tocris Bioscience, БП и ЛПС из *S. typhosa* – из Sigma-Aldrich.

Для определения интегральной цитотоксичности с помощью оборудования xCelligence RTCA, 10 тыс. клеток вносили в лунку специализированного планшета, позволяющего определять клеточный индекс в режиме реального времени и культивировали в полной среде Вильямса. На следующий день после пассажа среду меняли на содержащую 10 мкМ БП, 1 нМ FICZ, 10 нМ ITE, 1 мкг/мл ЛПС и их смеси. Мониторинг клеточного индекса проводили в течение 3 дней после добавления изучаемых соединений. Каждое соединение и их смеси вносили в 6 лунок экспериментального планшета.

Для получения данных по определению активированных молекулярных маркеров сигнальных путей, ассоциированных с гибелью клетки, и активации репарационных процессов, клетки культивировали в 24-луночных планшетах, промывали на следующий день после пассажа, добавляли среду, содержащую 10 мкМ БП, 1 нМ FICZ, 10 нМ ITE, 1 мкг/мл ЛПС и их смеси, и инкубировали 24 и 48 ч.

Клетки после инкубации дважды промывали ледяным раствором Хенкса и после тщательного удаления остатков жидкости замораживали при –70°C.

Замороженные клетки лизировали с помощью буферного раствора Cell Signaling Lysis Buffer (Millipore) с добавлением ингибитора протеаз (Complete, Roche) и фермента бензоназы. Полученные лизаты центрифугировали 10 мин при 12000 g, отбирали аликвоту супернатанта, в которой определяли концентрацию белка по протоколу DC Protein Assay (метод Лоури, реактивы Bio-Rad). Концентрацию белка в лизатах выравнивали и исследовали их на активность репарационных процессов, вызванных генотоксическим действием, по фосфорилированию/дефосфорилированию ключевых представителей сигнальных каскадов и белков системы репарации ДНК.

Маркеры сигнальных путей и генотоксического действия были проанализированы в клеточных лизатах с использованием многопараметрической иммунофлуоресцентной технологии Luminex xMAP. Для анализа использовали набор реактивов для определения ранних маркеров апоптоза (7-Plex MILLIPLEX MAP Early Apoptosis Magnetic Bead Kit, Кат. № 48-669MAG Merck/Millipore, США), который позволяет определять активированные фосфорилированные формы следующих белков: Akt1 (Ser473), p53 (Ser46), BAD (Ser112), Bcl-2 (Ser70), JNK (Thr183/Tyr185), а также активных форм каспазы-8 (гидролизованной по Asp384) и каспазы-9 (гидролизованной по Asp315). В этих же образцах определяли маркеры генотоксического действия с помощью набора реактивов MILLIPLEX MAP 7-plex DNADamage/Genotoxicity Magnetic Bead kit (Кат. № 48-621MAG, Merck/Millipore, США). Набор позволяет детектировать изменения в уровне фосфорилирования белков Chk1 (Ser 345), Chk2 (Thr68), H2A.X (Ser138), p53 (Ser15), а также определять уровень экспрессии белков ATR, MDM2, p21.

Статистическую обработку проводили в пакете Bio-Plex Data Pro Plus, используя однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA).

**Результаты и обсуждение.** Для проявления токсических свойств БП, ему необходимо пройти метаболическую активацию с помощью цитохромов P450, с образованием химически активных метаболитов диолэпоксидов БП. Клеточная линия HepaRG в настоящее время является единственной доступной иммортализованной линией, экспрессирующей цитохромы P450 на уровне, сопоставимом с экспрессией этого же типа ферментов в гепатоцитах человека [6].

С помощью измерения электрического импеданса (полного сопротивления) поверхности клеток можно в реальном времени интегрально оценивать целый ряд показателей, в том числе и скорость роста культуры в долговременных экспериментах [7].

На рисунке 1 представлены графики зависимости нормализованного клеточного

индекса от времени инкубации клеток НераRG с 10 мкМ БП, 1 нМ FICZ, 10 нМ ITE, 1 мкг/мл ЛПС из *S. typhosa* и их смеси. FICZ, ITE и ЛПС в исследуемых концентрациях заметно не влияют на рост культуры и пролиферацию клеток до 72 часов после добавки к клеткам (рис. 1 Б). БП в концентрации 10 мкМ, замедляет рост культуры с началом гибели клеток через 48 ч после введения, которые требуются на метаболическую активацию. Липополисахарид с БП усиливает гибель клеток, агонисты AhR в концентрации 1 нМ FICZ и 10 нМ ITE демонстрируют цитопротекторное влияние на токсическое действие БП (рис. 1 А).

Основной путь гибели клетки при действии БП – некроз, который вызывается гиперактивацией фермента PARP-1 и истощением клеточных резервов НАД<sup>+</sup> [8], что приводит к невозможности энергозависимого апоптотического пути гибели клетки [7].

При анализе молекулярных событий, ассоциированных с апоптозом, можно отметить, что основные маркеры апоптоза при действии БП не активировались, активные формы каспазы-8 и каспазы-9 и активные формы белков BAD (Ser112) и Bcl-2 (Ser70) не накапливались в клеточных экстрактах в течение 48 часов токсического действия БП.

Однако, БП вызывал статистически значимое повышение уровня активных фосфорилированных форм белка Akt (Ser473), c-Jun N-концевой киназы – JNK (Thr183/Thr185) и белка p53 (Ser15 и Ser46) (рис. 2).

Агонисты арилгидрокарбонового рецептора FICZ и ITE статистически значимо повышали уровень активных форм белка Akt через 24 ч и через 48 ч (для ITE) дополнительно к повышению, вызванному БП. На повышение уровня фосфорилированной формы стресс-активируемой киназы JNK, вызванной БП, FICZ и ITE влияния не оказывали.

FICZ и ITE снижали в сторону контрольных значений уровень фосфорилированных форм белка p53 через 24 часа, повышение которых было вызвано БП, и демонстрировали разнонаправленную динамику через 48 ч.

Во всех случаях в смеси БП с ЛПС для этих белков уровни были ниже контрольных (рис. 2).

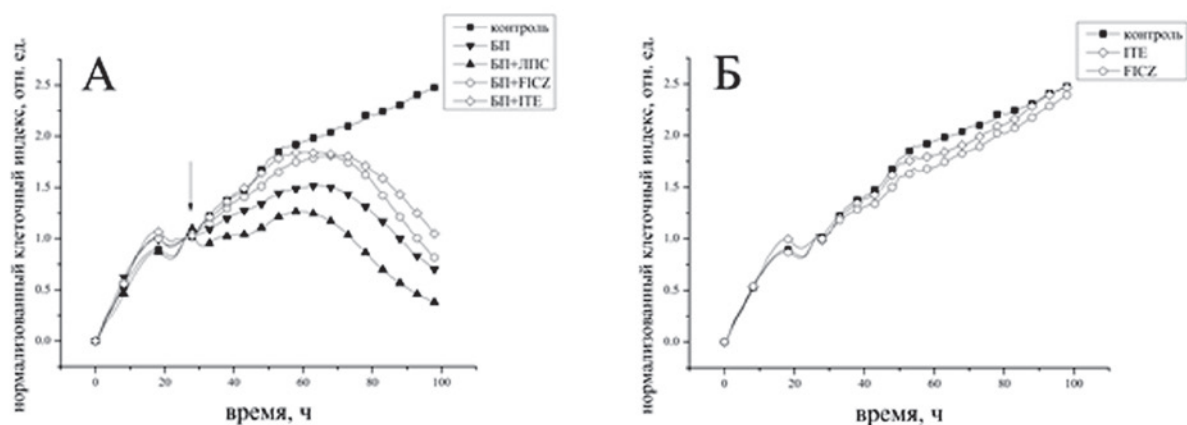
Общий уровень белка ATR в клеточном лизате при действии БП незначительно повышается, FICZ и ITE снижают это повышение в первые сутки действия. На вторые сутки повышенный уровень белка отмечен только для смеси БП и ITE.

Общий уровень эффекторного белка MDM2 при действии БП в клеточных лизатах повышается практически в 2 раза, FICZ и ITE демонстрируют разнонаправленное влияние на это повышение. На вторые сутки уровни белка MDM2 для БП и смеси БП с агонистами AhR не отличаются от контрольного уровня. Уровни белков ATR и MDM2 для смеси БП и ЛПС были существенно ниже контрольных значений на первые и вторые сутки действия.

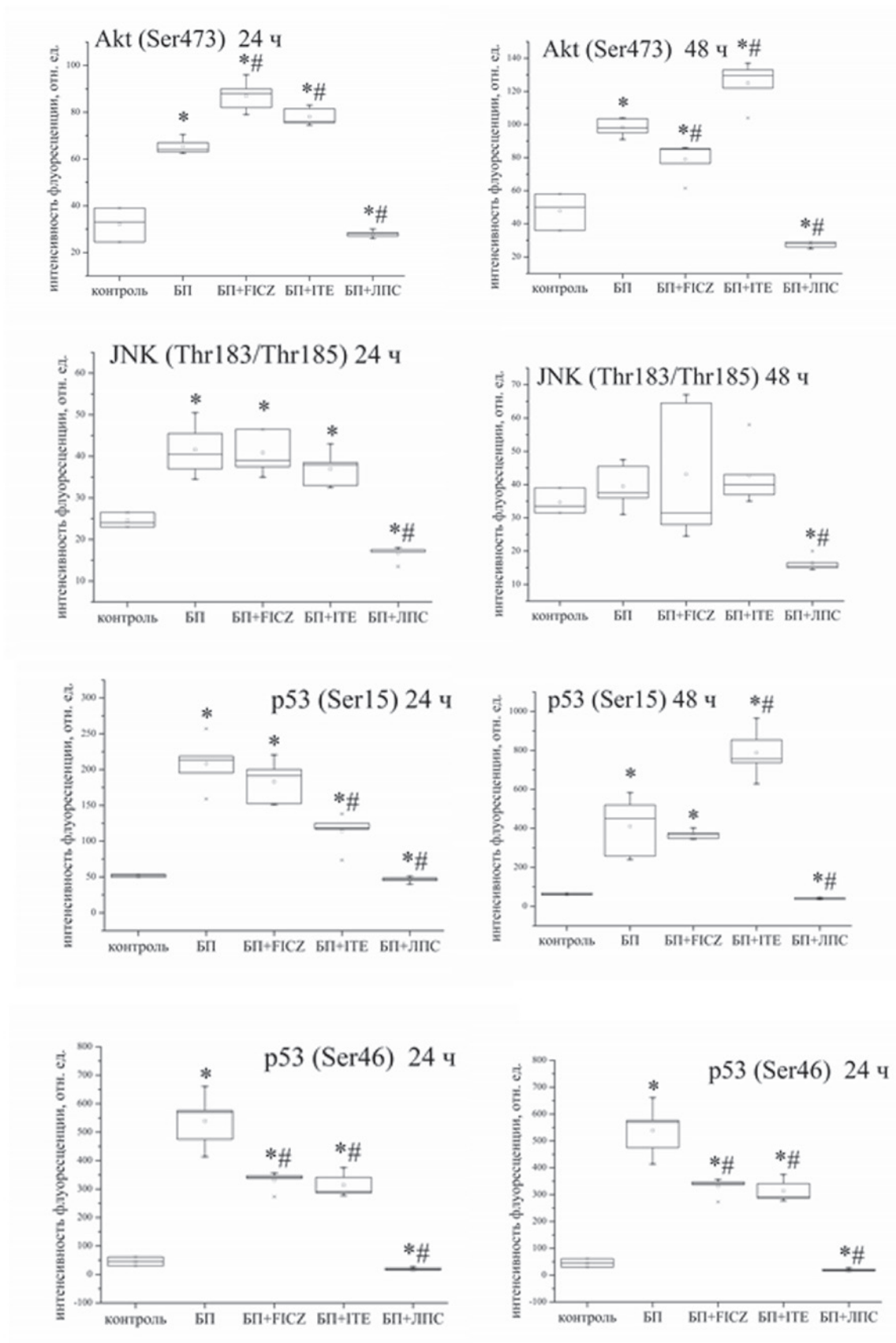
Уровень активной формы медиаторного белка – гистона H2A.X, фосфорилированного по Ser139, незначительно повышается в первые сутки действия БП, смеси БП и FICZ и смеси БП с ЛПС; а смесь БП с ITE снижает этот уровень ниже контрольных значений (рис. 3).

Уровни активных форм чекпойнт-киназ Chk1 и Chk2 статистически значимо повышаются при действии БП, агонисты AhR снижают это повышение в первые сутки и демонстрируют разнонаправленную динамику на вторые сутки. Смесь БП и ЛПС также снижает уровень активных форм чекпойнт-киназ ниже контрольного уровня через 24 ч и 48 ч после введения (рис. 4).

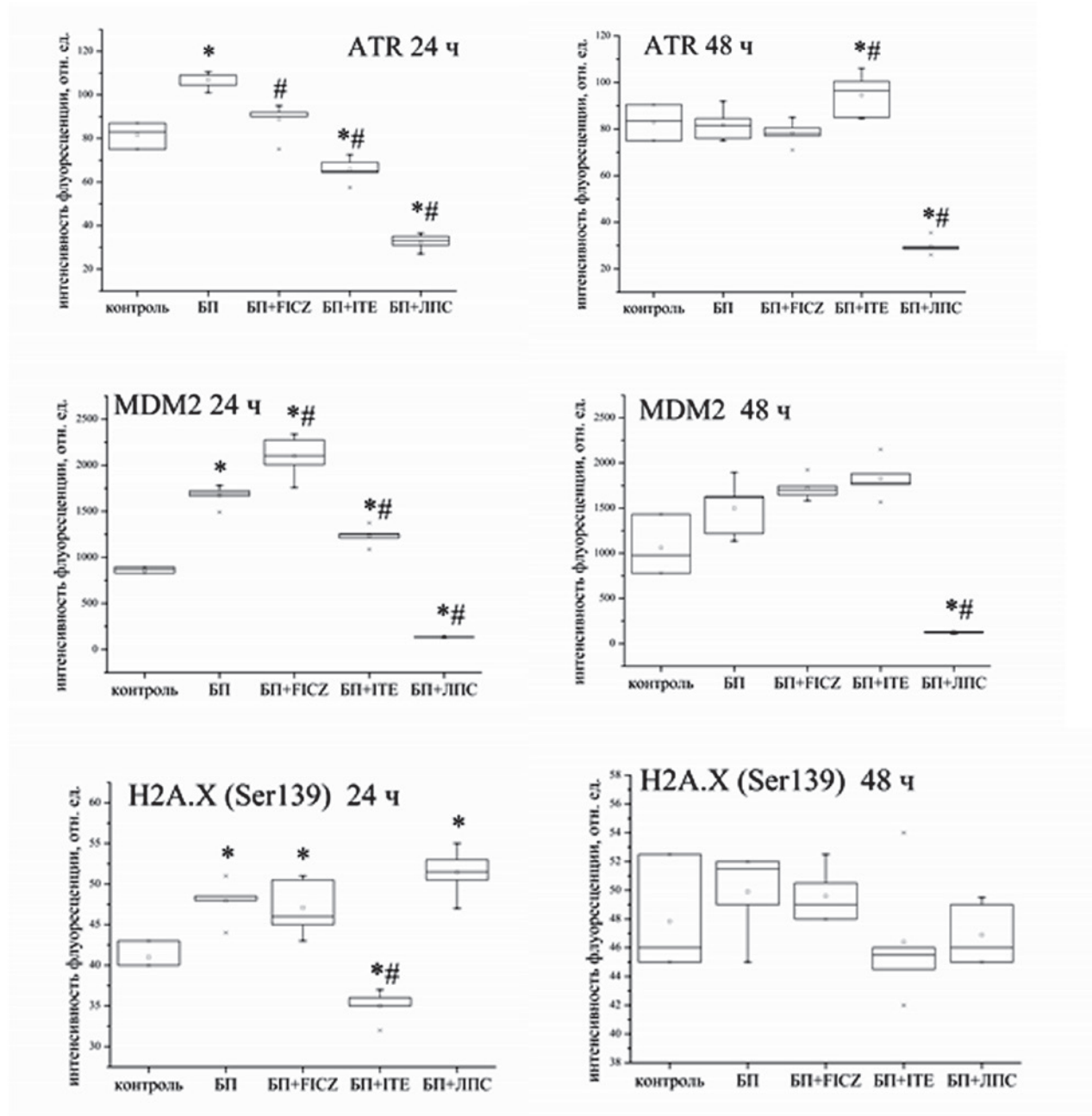
Таким образом, липополисахарид в смеси с БП значительно снижает уровень активных форм ре-



**Рис. 1.** График зависимости нормализованного усредненного ( $n=6$ ) клеточного индекса клеток линии НераRG от времени в присутствии 10 мкМ БП, 1 нМ FICZ, 10 нМ ITE, 1 мкг/мл ЛПС и их смеси. Отмечено время введения изучаемых соединений. Контрольные клетки культивировали в полной среде Вильямса E.



**Рис. 2.** Интенсивность флуоресценции (диаграмма размаха, среднее, границы 1-3 квартилей) фосфорилированных белков Akt1 (Ser473), JNK (Thr183/Thr185) и белка p53 (Ser15 и Ser46) в лизатах клеток НераRG через 24 ч и 48 ч после добавления БП, смеси БП+FICZ, смеси БП+ITE и смеси БП+ЛПС.  
 \* -  $p < 0,05$  по сравнению с контролем, # -  $p < 0,05$  по сравнению с БП (ANOVA).



**Рис. 3.** Интенсивность флуоресценции (диаграмма размаха, среднее, границы 1-3 квартилей) белков ATR, MDM2 и активной формы гистона H2A.X (Ser139) в лизатах клеток НераRG через 24 ч и 48 ч после добавления БП, смеси БП+FICZ, смеси БП+ITE и смеси БП+ЛПС.

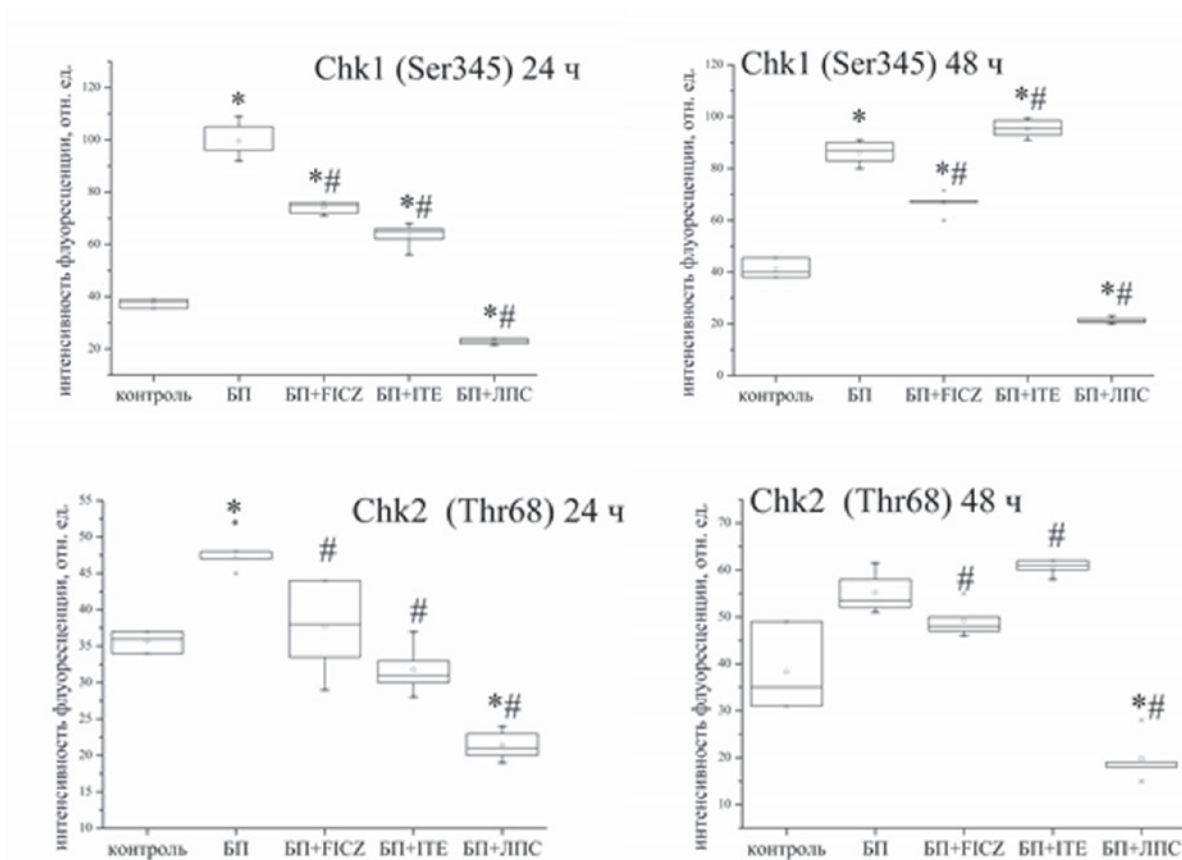
\* -  $p < 0,05$  по сравнению с контролем, # -  $p < 0,05$  по сравнению с БП (ANOVA).

гуляторных белков в клеточных лизатах через 24 ч и 48 ч после введения, часто даже ниже контрольных значений, что на фоне большей цитотоксичности свидетельствует о быстром развитии некроза.

Добавка FICZ и ITE в смесь к БП приводила к меньшей цитотоксичности БП. Агонисты AhR увеличивали уровень активной формы киназы Akt1 дополнительно к повышению, вызванному БП, что демонстрирует дополнительный сигнал к выживанию клеток и снижали уровни активных форм транскрипционного фактора p53

и чекпойнт-киназ Chk1 и Chk2, что подтверждает меньшую активацию репарационных процессов, индуцированных БП. FICZ и ITE демонстрировали разнонаправленную динамику на 2 сутки для ряда маркеров генотоксичности, что скорее всего связано с индивидуальными свойствами изучаемых агонистов AhR.

В ряде работ было продемонстрировано, что БП способен индуцировать провоспалительный ответ [9], а индукторы воспаления усиливают генотоксичность БП [10,11]. У мышей, с вызванным ЛПС воспалением, детектируе-



**Рис. 4.** Интенсивность флуоресценции (диаграмма размаха, среднее, границы 1-3 квартилей) активных форм чекпойнт-киназ Chk1 (Ser345) и Chk2 (Thr68) в лизатах клеток HepaRG через 24 ч и 48 ч после добавления БП, смеси БП+FICZ, смеси БП+ITE и смеси БП+ЛПС.

\* -  $p < 0,05$  по сравнению с контролем, # -  $p < 0,05$  по сравнению с БП (ANOVA).

мые уровни аддуктов БП с ДНК были выше, чем при действии одного БП [12,13].

При анализе изменений экспрессий генов в тканях легких мышей, экспонированных БП, ЛПС и смесью БП и ЛПС было установлено, что смесь БП и ЛПС снижает уровень мРНК генов Cyp1A1, эпоксидгидролазы, глутатион-S-трансферазы, SULT и повышает экспрессию генов UGT,  $\beta$ -глюкуронидазы, что способствует конвертации UGT-метаболитов в свободные формы, и также усиливает формирование БП-ДНК аддуктов на третьи сутки после экспонирования [14]. По нашим данным, гибель клеток после обработки смесью БП и ЛПС начинается уже на 1 сутки и система репарации фактически является «выключенной», что свидетельствует о масштабном повреждении ДНК, что согласуется с увеличением концентрации БП-ДНК аддуктов [13]. Изменение экспрессии генов 1 и 2 фазы метаболизма детоксикации ксенобиотиков в меньшей степени влияет на усиление токсичности смеси БП и ЛПС. По нашему мнению, токсичность БП усиливается в присутствии активаторов NF- $\kappa$ B за счет увеличения доставки БП в ядро, с использованием цитоплазматически-ядерной транспортной системы доставки транскрипционного фактора в ядро. NF- $\kappa$ B явля-

ется индуцибельным транскрипционным фактором, в интактных клетках локализован в цитоплазме в комплексе с ингибиторной субъединицей I $\kappa$ B- $\alpha$ . При активации ингибиторная субъединица фосфорилируется ИКК комплексом, и быстро деградирует в протеасомах. Согласно данным иммунопреципитации, AhR и p65 субъединица NF- $\kappa$ B, взаимодействуют, это взаимодействие усиливается в присутствии БП и разрушается в присутствии активаторов NF- $\kappa$ B [15]. Согласно ранее предложенному механизму взаимодействия, часть AhR может находиться в комплексе с NF- $\kappa$ B и ингибиторной субъединицей I $\kappa$ B- $\alpha$ , взаимодействие может осуществляться через PAS домен, который также имеется у других белков семейства I $\kappa$ B – c-Rel и RelB. ЛПС через TLR-рецептор быстро активирует ИКК комплекс, что приводит к деградации I $\kappa$ B- $\alpha$  и разрушению комплекса AhR и NF- $\kappa$ B. При разрушении комплекса AhR и NF- $\kappa$ B БП может быстро попадать в ядро в составе транспортной системы транскрипционных факторов и вызвать масштабное повреждение ДНК, с которой не справляется система репарации. В итоге уже на первые сутки инкубации клетки гибнут по некротическому пути.

Нетоксичные высокоаффинные агонисты AhR конкурируют за рецептор с БП и снижают



вероятность попадания его в ядро, что приводит в более сильной активации сигналов к выживанию клетки (Akt) и менее выраженной активации белков, контролирующих клеточный цикл – чекпойнт-киназ и транскрипционного фактора p53. Снижение генотоксичности БП

в присутствии агонистов AhR приводит к меньшей гибели клеток на фоне токсического действия БП. Арилгидрокарбонный рецептор и его агонисты могут также рассматриваться как потенциальные мишени для противоопухолевой терапии [16].

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Coates P.J., Lorimore S.A., Wright E.G. Cell and tissue responses to genotoxic stress. *J Pathol.* 2005; 205(2): 221-227.
2. Shimada T. Inhibition of carcinogen-activating cytochrome P450 enzymes by xenobiotic chemicals in relation to antimutagenicity and anticarcinogenicity. *Toxicol Res.* 2017; 33(2):79-90.
3. Siddens L.K., Larkin A., Krueger S.K., et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons as skin carcinogens: comparison of benzo[a]pyrene, dibenzo[def,p]chrysene and three environmental mixtures in the FVB/N mouse. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2012; 264(3): 377-86.
4. Niida H., Nakanishi M. DNA damage checkpoints in mammals. *Mutagenesis.* 2006; 21(1):3-9.
5. Babakov V.N., Rogovskaya N.Yu., Kurdyukov I.D., Belyukov P.P., Dulov S.A., Radilov A.S. Влияние бенз(а)пирена и эндогенного агониста арил-гидрокарбонного рецептора FICZ на активацию транскрипционного фактора NF-В и цитокиновый секретом в клетках гепатомы человека линии HepaRG. *Медицина экстремальных ситуаций.* 2018; 20(3): 432-438.
6. Lübbert M., Müller-Vieira U., Mayer M., Biemel K.M., Knöspel F., Knobloch D., et al. HepaRG human hepatic cell line utility as a surrogate for primary human hepatocytes in drug metabolism assessment in vitro. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* 2011; 63(1): 59-68.
7. Lin T., Yang M.S. Benzo[a]pyrene-induced necrosis in the HepG2 cells via PPAR-1 activation and NAD+ depletion. *Toxicology.* 2008; 245(1-2): 147-153.
8. Rogovskaya N. Yu., Babakov V. N. Маркеры апоптоза – молекулярные мишени токсического действия сернистого иприта. *Токсикологический вестник.* 2017; (5): 28-34.
9. Волков М.С., Кобляков В.А. Активация транскрипционного фактора NF-кВ в клетках гепатом под действием канцерогенных полициклических ароматических углеводородов. *Цитология.* 2011; 53(5): 418-422.
10. Smerdova L., Neca J., Svobodova J., Topinka J., Schmuczerova J., Kozubik A., et al. Inflammatory mediators accelerate metabolism of benzo[a]pyrene in rat alveolar type II cells: the role of enhanced cytochrome P450 1B1 expression. *Toxicology.* 2013; 314: 30-38.
11. Uno S., Makishima M. Benzo[a]pyrene toxicity and inflammatory disease. *Curr. Rheumatol. Rev.* 2009; 5: 266-271.
12. Arit V.M., Kraiss A.M., Godschalk R.W., Riffo-Vasquez Y., Mrizova I., Roufosse et al. Pulmonary inflammation impacts on CYP1A1-mediated respiratory tract DNA damage induced by the carcinogenic air pollutant benzo[a]pyrene. *Toxicol. Sci.* 2015; 146: 213-225.
13. Shi Q., Haenen G.R., Maas L., Arit V.M., Spina D., Vasquez Y.R., et al. Inflammation-associated extracellular beta-glucuronidase alters cellular responses to the chemical carcinogen benzo[a]pyrene. *Arch. Toxicol.* 2016; 90: 2261-2273.
14. Shi Q., Fijten R.R., Spina D., Riffo Vasquez Y., Arit V.M., Godschalk R.W., et al. Altered gene expression profiles in the lungs of benzo[a]pyrene-exposed mice in the presence of lipopolysaccharide-induced pulmonary inflammation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2017; 336:8-19.
15. Voronov I., Li K., Tenenbaum H.C., Manolson M.F. Benzo[a]pyrene inhibits osteoclastogenesis by affecting RANKL-induced activation of NF-кВ. *Biochem. Pharmacol.* 2008; 75(10): 2034-2044.
16. Воронцова Ю.Е., Черезов Р.О., Кузин Б.А., Симонова О.Б. Арил-гидрокарбонный рецептор как потенциальная мишень для противораковой терапии. *Биомедицинская химия* 2018; 64(5): 397-415.
1. Coates P.J., Lorimore S.A., Wright E.G. Cell and tissue responses to genotoxic stress. *J Pathol.* 2005; 205(2):221-35.
2. Shimada T. Inhibition of carcinogen-activating cytochrome P450 enzymes by xenobiotic chemicals in relation to antimutagenicity and anticarcinogenicity. *Toxicol Res.* 2017; 33(2):79-96.
3. Siddens L.K., Larkin A., Krueger S.K., et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons as skin carcinogens: comparison of benzo[a]pyrene, dibenzo[def,p]chrysene and three environmental mixtures in the FVB/N mouse. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2012; 264(3): 377-86.
4. Niida H., Nakanishi M. DNA damage checkpoints in mammals. *Mutagenesis.* 2006; 21(1):3-9.
5. Babakov V.N., Rogovskaya N.Yu., Kurdyukov I.D., Belyukov P.P., Dulov S.A., Radilov A.S. The effect of benzo(a)-pyrene and the endogenous agonist of the aryl hydrocarbon receptor FICZ on the activation of the transcription factor NF-кВ and the cytokine secretion in human hepatoma HepaRG cells. *Medicine of Extreme Situations.* 2018; 20(3): 432-438 (in Russian).
6. Lübbert M., Müller-Vieira U., Mayer M., Biemel K.M., Knöspel F., Knobloch D., et al. HepaRG human hepatic cell line utility as a surrogate for primary human hepatocytes in drug metabolism assessment in vitro. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* 2011; 63(1): 59-68.
7. Lin T., Yang M.S. Benzo[a]pyrene-induced necrosis in the HepG2 cells via PPAR-1 activation and NAD+ depletion. *Toxicology.* 2008; 245(1-2): 147-153.
8. Rogovskaya N.Yu., Babakov V.N. Apoptosis markers are molecular targets of sulfure mustard toxic action. *Toksikologicheski vestnik (Toxicological Review).* 2017; (5): 28-34 (in Russian).
9. Volkov M.S., Kobliakov V.A. Activation of transcription factor NF-kappaB by carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Tsitologia.* 2011; 53(5):418-22. (In Russian).
10. Smerdova L., Neca J., Svobodova J., Topinka J., Schmuczerova J., Kozubik A., et al. Inflammatory mediators accelerate metabolism of benzo[a]pyrene in rat alveolar type II cells: the role of enhanced cytochrome P450 1B1 expression. *Toxicology.* 2013; 314: 30-38.
11. Uno S., Makishima M. Benzo[a]pyrene toxicity and inflammatory disease. *Curr. Rheumatol. Rev.* 2009; 5: 266-271.
12. Arit V.M., Kraiss A.M., Godschalk R.W., Riffo-Vasquez Y., Mrizova I., Roufosse et al. Pulmonary inflammation impacts on CYP1A1-mediated respiratory tract DNA damage induced by the carcinogenic air pollutant benzo[a]pyrene. *Toxicol. Sci.* 2015; 146: 213-225.
13. Shi Q., Haenen G.R., Maas L., Arit V.M., Spina D., Vasquez Y.R., et al. Inflammation-associated extracellular beta-glucuronidase alters cellular responses to the chemical carcinogen benzo[a]pyrene. *Arch. Toxicol.* 2016; 90: 2261-2273.
14. Shi Q., Fijten R.R., Spina D., Riffo Vasquez Y., Arit V.M., Godschalk R.W., et al. Altered gene expression profiles in the lungs of benzo[a]pyrene-exposed mice in the presence of lipopolysaccharide-induced pulmonary inflammation. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2017; 336:8-19.
15. Voronov I., Li K., Tenenbaum H.C., Manolson M.F. Benzo[a]pyrene inhibits osteoclastogenesis by affecting RANKL-induced activation of NF-кВ. *Biochem. Pharmacol.* 2008; 75(10): 2034-2044.
16. Vorontsova J.E., Cherezov R.O., Kuzin B.A., Simonova O.B. Aryl-hydrocarbon receptor as a potential target for anticancer therapy. *Biomed. Khim.* 2018; 64(5): 397-415 (in Russian).

V.N. Babakov, N.Yu. Rogovskaya, I.D. Kurdyukov, P.P. Belyukov, S.A. Dulov, A.S. Radilov

## EFFECT OF ARYL HYDROCARBON RECEPTOR AGONISTS AND LIPOPOLYSACCHARIDE ON BENZO(A)PYRENE GENOTOXICITY MARKERS

Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology, Federal Medical Biological Agency, Saint Petersburg, Russian Federation

The effect of aryl hydrocarbon receptor agonists (FICZ and ITE), as well as lipopolysaccharide under the toxic action of benzo(a)pyrene in HepaRG human hepatoma cells was evaluated. Active forms of the key stress-activated kinase cascades and DNA repair system proteins were used as markers of the genotoxic action of benzo(a)pyrene. A mixture of lipopolysaccharide with benzo(a)pyrene increases benzo(a)pyrene cytotoxicity and reduces the activation of DNA repair system proteins below the control level. Aryl hydrocarbon receptor agonists (FICZ and ITE) exhibit a cytoprotective effect against benzo(a)pyrene, enhance Akt1 kinase activation, and downregulate activation of the p53 protein and Chk1 and Chk2 checkpoint kinases. Thus, FICZ and ITE reduce the genotoxicity of benzo(a)pyrene.

**Keywords:** polyaromatic hydrocarbons, benzo(a)pyrene, aryl hydrocarbon receptor, HepaRG, NF-kappaB, genotoxicity.

Материал поступил в редакцию 23.04.2019 г.

УДК 547.1 : 615.246

# ВЛИЯНИЕ ЖИРНЫХ КИСЛОТ НА СВЯЗЫВАЮЩУЮ И ЭСТЕРАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ АЛЬБУМИНА ПО ОТНОШЕНИЮ К ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИМ СОЕДИНЕНИЯМ ПО ДАННЫМ МОЛЕКУЛЯРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ

Д.А. Белинская<sup>1</sup>, А.А. Баталова<sup>1</sup>,  
Н.В. Гончаров<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, 194223, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

<sup>2</sup>Федеральное государственное унитарное предприятие «НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека» Федерального медико-биологического агентства, 188663, г.п. Кузьмоловский, Ленинградская область, Российская Федерация

Одна из актуальных задач клинической токсикологии – разработка терапии, направленной на стехиометрическую и/или каталитическую детоксикацию фосфорорганических соединений (ФОС) в кровеносном русле, что предотвратит попадание яда в нервно-мышечные и нейрональные синапсы и поможет избежать необратимых последствий отравления. Вспомогательным вариантом детоксикации ФОС в кровеносном русле может стать направленное воздействие на альбумин, основной транспортный белок крови, с помощью молекул, модулирующих его связывающие и/или эстеразные свойства. Цель представленного исследования – методами молекулярного моделирования на примере параоксона и олеиновой кислоты оценить влияние жирных кислот на связывающую и эстеразную активность альбумина человека по отношению к ФОС. Согласно полученным данным, повышенная концентрация жирных кислот в крови будет снижать вероятность связывания параоксона с альбумином и уменьшать вероятность псевдоэстеразной реакции.

**Ключевые слова:** сывороточный альбумин человека, фосфорорганические соединения, жирные кислоты, молекулярное моделирование.

**Введение.** Отравления фосфорорганическими соединениями (ФОС) занимают в общем числе экзотоксикозов одно из ведущих мест [1]. Поскольку механизм токсического действия ФОС на организм обусловлен главным образом ингибированием ацетилхолинэстеразы (АХЭ), существующие принципы терапии острых отравлений сводятся к предотвращению и ликвидации последствий воздействия ФОС на АХЭ [2]. Среди различных вариантов терапии – стехиометрическая и/или каталитическая детоксикация ФОС в кровеносном русле, что предотвратит попадание яда в нервно-мышечные и нейро-

нальные синапсы с последующим ингибированием АХЭ.

Сывороточный альбумин является мажорным белком сыворотки крови. Установлено, что альбумин может участвовать в детоксикации ФОС посредством их связывания и/или гидролиза [3-5]. В молекуле альбумина существуют два основных сайта связывания лекарственных средств и ксенобиотиков: Садлоу I и Садлоу II. Предполагается, что сайт Садлоу I с каталитическим тирозином Tyr150 отвечает за истинную эстеразную активность белка, а сайт Садлоу II – за псевдоэстеразную. Способом детоксикации ФОС в кровеносном

**Белинская Дарья Александровна (Belinskaja Daria Alexandrovna)**, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории сравнительной физиологии сенсорных систем Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, d\_belinskaya@mail.ru

**Баталова Анастасия Александровна (Batalova Anastasia Alexandrovna)**, аспирант, младший научный сотрудник лаборатории сравнительной биохимии ферментов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, batalova.phys@gmail.com

**Гончаров Николай Васильевич (Goncharov Nikolay Vasil'evich)**, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник Федерального государственного унитарного предприятия «НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека» федерального медико-биологического агентства России; заведующий лабораторией сравнительной биохимии ферментов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, ngoncharov@gmail.com

русле может стать направленное воздействие на альбумин с помощью молекул, модулирующих его связывающие и/или эстеразные свойства [5-6]. Основным кандидатом в модуляторы являются мажорные жирные кислоты (ЖК): олеиновая, пальмитиновая, стеариновая и линолевая. Концентрация каждой из них в норме составляет десятки или даже сотни мкМ [7]. Известно, что альбумин человека при взаимодействии с ЖК в растворе обладает высокой пластичностью и гибкостью [8]. Во многих работах показано влияние ЖК на сродство альбумина к различным лигандам [9-11]. Поэтому нельзя исключать влияния связывания ЖК с альбумином на эффективность его взаимодействия с ФОС.

Методом рентгеноструктурного анализа (РСА) было показано, что в молекуле альбумина существует семь сайтов связывания ЖК: FA1 (возле Ala158), FA2 (возле Leu22), FA3 (возле Asn391), FA4 (возле Tyr411), FA5 (возле Ala528), FA6 (возле Ala213), FA7 (возле Tyr150) [12]. Окружение сайта FA4 соответствует сайту Садлоу II, а сайта FA7 – сайту Садлоу I. Согласно литературным данным, олеиновая кислота обладает максимальным сродством к сайту FA5, и чуть меньшим сродством к сайту FA2 [13]. Цель представленного исследования – методами *in silico* на примере олеиновой кислоты и параоксона изучить влияние жирных кислот на связывающую и эстеразную активность альбумина человека (ЧСА) по отношению к ФОС. Для этого методом молекулярной динамики были изучены геометрические характеристики комплексов параоксона с сайтами Садлоу I и Садлоу II ЧСА в отсутствие и в присутствии молекул олеиновой кислоты в сайтах FA5 и FA2. Были оценены значения свободной энергии образования этих комплексов.

**Материалы и методы исследования.** Конформационные изменения комплексов альбумина с лигандами во времени были рассчитаны методом молекулярной динамики с помощью программного пакета Gromacs 5.0.4 [14]. Каждый комплекс виртуально был помещен в периодическую кубическую ячейку, заполненную молекулами воды. Для описания молекул воды использовали модельный потенциал SPC (single point charge), приведенный в работе в [15]. Для нейтрализации заряда в систему были добавлены ионы натрия. Для поддержания в расчетном эксперименте постоянной температуры 300 К и постоянного давления 1 бар применяли термостат с масштабируемыми скоростями «V-rescale» [16] и баростат Берендсена [17] с временными константами 0,1 пс и 1 пс, соответственно. Дальние электростатические взаимо-

действия рассчитывали методом Эвальда [18]. Взаимодействия Леннард-Джонса не учитывались при межатомном расстоянии больше 1 нм. Длины связей в молекулах альбумина и лигандов поддерживались постоянными с помощью алгоритма LINCS [19]. Расчету конформационных изменений комплексов белок-лиганд предшествовала релаксация системы длиной 100 пс. Время симуляции конформационных изменений комплексов методом молекулярной динамики (длина траектории) составило 10 нс с шагом интегрирования 0.002 пс.

Расчет свободной энергии связывания лигандов с альбумином проводили методом, сочетающим использование молекулярной механики и решение уравнения Пуассона-Больцмана (molecular mechanics – Poisson Boltzmann surface area, MM-PBSA) [20] с помощью модуля *g\_mmpbsa* [21], встроенного в программный пакет Gromacs. Метод MM-PBSA позволяет оценить энергию образования комплекса белок-лиганд из траекторий молекулярной динамики. Предыдущие исследования выявили, что в течение симуляции молекулярной динамикой происходят очень большие колебания энтропии [21]. Было показано, что расчет только энтальпийного компонента лучше коррелирует с экспериментальными данными, чем расчет полной свободной энергии. Поэтому в данной работе рассчитывали только энтальпийную составляющую свободной энергии образования комплекса. В данной работе значение свободной энергии образования комплекса рассчитывали каждые 10 пс в течение симуляции. Таким образом, результатом запуска модуля *g\_mmpbsa* для одной траектории молекулярной динамики было 1000 значений свободной энергии. Итоговое значение рассчитывали из полученных 1000 значений как среднее  $\pm$  стандартное среднее отклонение.

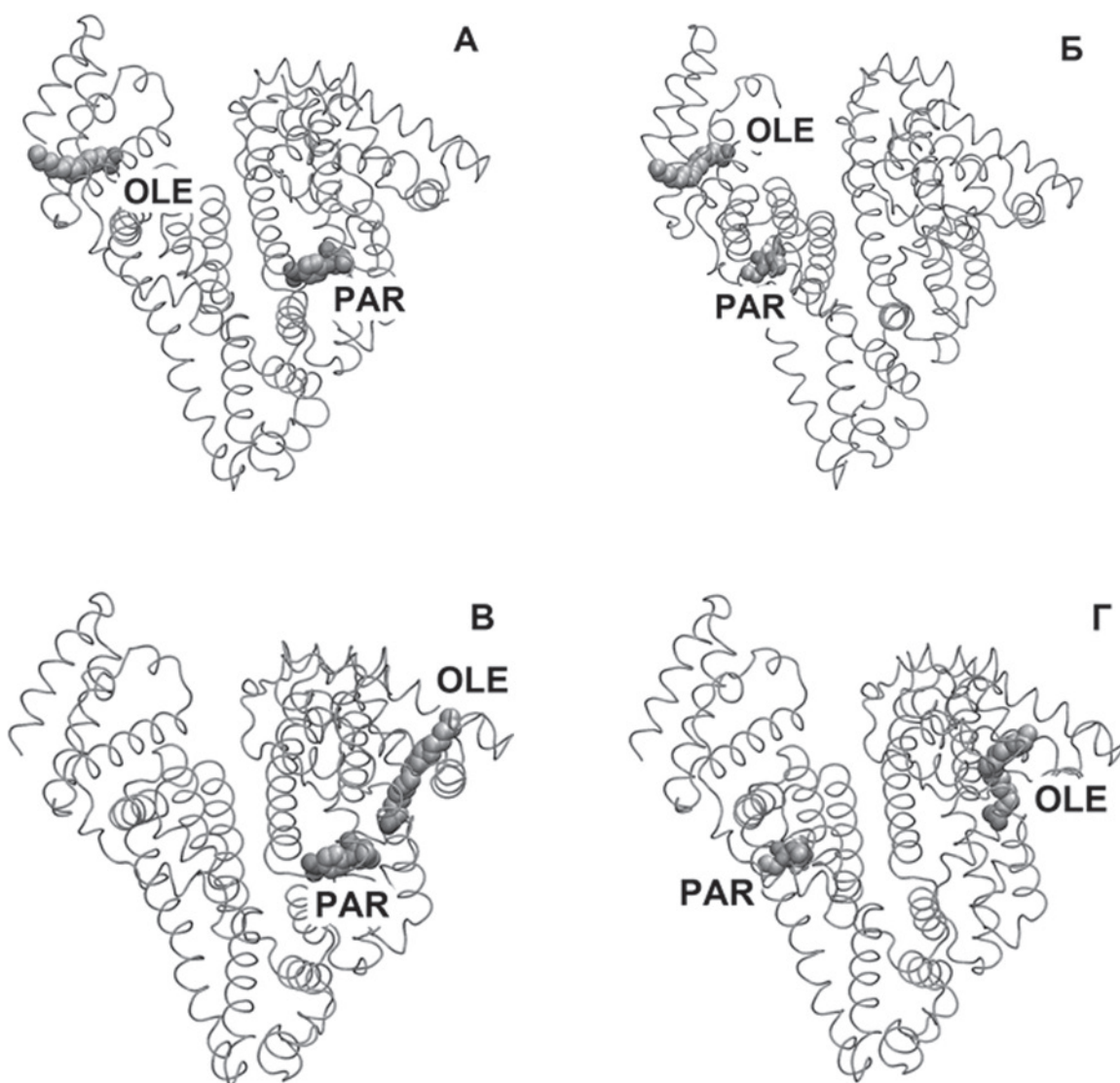
**Результаты и обсуждение.** Структуры комплексов ЧСА с молекулой параоксона в сайтах Садлоу I и Садлоу II и комплексов ЧСА с молекулой олеиновой кислоты в сайтах FA5 и FA2 были получены нами ранее методом молекулярного докинга [5, 22-23]. Путём объединения координат атомов были получены модели тройных комплексов альбумина, параоксона и олеиновой кислоты (модели 1-4).

Модель 1: Олеиновая кислота в сайте FA5, параоксон в сайте Садлоу I (рис. 1А)

Модель 2: Олеиновая кислота в сайте FA5, параоксон в сайте Садлоу II (рис. 1Б)

Модель 3: Олеиновая кислота в сайте FA2, параоксон в сайте Садлоу I (рис. 1В)

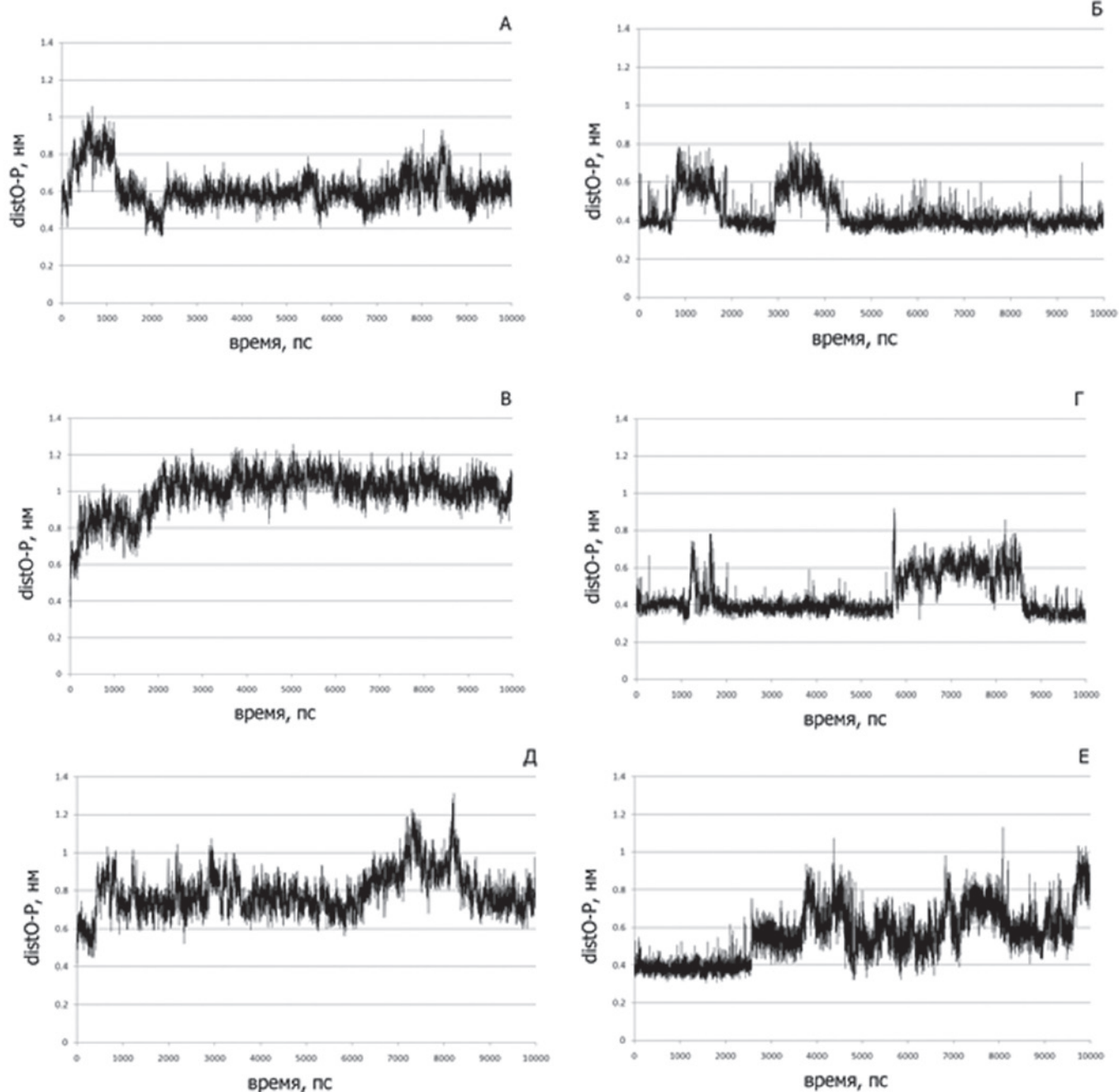
Модель 4: Олеиновая кислота в сайте FA2, параоксон в сайте Садлоу II (рис. 1Г)



**Рис. 1.** Комплексы альбумина с параоксоном (PAR) в сайте Садлоу I (А, В) и Садлоу II (Б, Г) и олеиновой кислотой (OLE) в сайте FA5 (А, Б) и FA2 (В, Г) по данным молекулярного докинга.

На следующем этапе конформационные изменения полученных комплексов были рассчитаны методом молекулярной динамики. По полученным траекториям движений атомов для каждого комплекса была рассчитана зависимость от времени значения расстояния между атомом фосфора параоксона и гидроксильным атомом кислорода каталитического тирозина ( $distO-P$ ) (рис. 2). Известно, что для образования новой ковалентной связи между параоксоном и тирозином это расстояние не должно превышать 0.4 нм [24]. Ранее такая зависимость уже была изучена нами для комплексов параоксона с альбумином в отсутствие жирных кислот [23] (рис. 2А,Б). Было выявлено, что комплекс альбу-

мина человека со связанной молекулой параоксона в сайте Садлоу I нестабилен (рис. 2А). Значение  $distO-P$  первые 2000 пс симуляции колеблется в промежутке 0.4-1.0 нм, затем оставшиеся 8000 пс симуляции остаются неизменным и колеблется незначительно на уровне 0.6 нм. В случае комплекса параоксона с сайтом Садлоу II, динамика этой зависимости выглядит следующим образом (рис. 2Б): участки, на которых расстояние колеблется в пределах 0.37-0.40 нм (что достаточно близко для образования ковалентной связи между лигандом и белком), чередуются с участками, на которых молекула параоксона отдаляется от каталитического тирозина.



**Рис. 2.** Зависимость от времени значения расстояния (distO-P) между атомом фосфора параоксона и гидроксильным атомом кислорода каталитического тирозина Ty150 для сайта Садлоу I (А, В, Д) и Tyr411 для сайта Садлоу II (Б, Г, Е). А, Б – комплекс альбумина с параоксоном в отсутствие жирных кислот; В, Г – комплекс альбумина с параоксоном в присутствии молекулы олеиновой кислоты в сайте FA5; Д, Е – комплекс альбумина с параоксоном в присутствии молекулы олеиновой кислоты в сайте FA2.

Связывание молекулы олеиновой кислоты в сайте FA5 влияет на геометрию связывания параоксона в сайте Садлоу I (рис. 2В). Расстояние между атомом фосфора параоксона и гидроксильным атомом кислорода каталитического тирозина быстро увеличивается

в первые 2000 пс симуляции, затем остается неизменным на протяжении почти всей симуляции и колеблется вблизи значения 1 нм, то есть в этом случае устойчивая конформация параоксона в сайте Садлоу I отличается от устойчивой конформации параоксона в сво-

**Значения свободных энергий ( $\Delta G$ , ккал/моль) образования комплексов альбумина с параоксоном в отсутствие и присутствии олеиновой кислоты**

параоксон	Олеиновая кислота		
	отсутствует	в сайте FA5	в сайте FA2
в сайте Садлоу I	-20.8±2.5	-21.8±2.8	-17.7±2.4
в сайте Садлоу II	-25.2±2.8	-23.0±2.9	-24.9±2.6

бодном от ЖК белке. Примечательно, что, даже находясь в другом домене альбумина (рис. 2А), молекула олеиновой кислоты влияет на положение параоксона в сайте Садлоу I.

Связывание молекулы олеата в сайте FA2, который находится в непосредственной близости от сайта Садлоу I (рис. 1В), ожидаемо повлиял на положение молекулы параоксона в сайте Садлоу I. Конформация параоксона в сайте также стабилизируется за 2000 пс симуляции, затем расстояние между атомом фосфора параоксона и гидроксильным атомом кислорода каталитического тирозина остается практически неизменным и колеблется незначительно в районе величины 0.8 нм. И снова устойчивая конформация параоксона в сайте Садлоу I отличается от устойчивой конформации параоксона в свободном от ЖК белке и в белке со связанной в сайте FA5 молекулой олеиновой кислоты. Таким образом, связывание олеиновой кислоты в сайтах FA5 и FA2 влияет на геометрию комплекса альбумин-параоксон, но не влияет на вероятность образования ковалентной связи между параоксоном и каталитическим Tyr150, то есть на эстеразную активность альбумина.

Связывание молекулы олеиновой кислоты в сайте FA5 практически не изменяет геометрию связывания параоксона в сайте Садлоу II (рис. 2Г). Как и в случае отсутствия олеиновой кислоты, участки, на которых расстояние distO-P колеблется в пределах 0.37-0.40 нм, чередуются с участками, на которых молекула параоксона отдалается от каталитического тирозина. В целом, связывание олеиновой кислоты в сайте FA5 не влияет на вероятность образования новой ковалентной связи в сайте Садлоу II, то есть не влияет на псевдоэстеразную активность альбумина по отношению к параоксоном.

Связывание молекулы олеиновой кислоты в сайте FA2 существенно влияет на геометрию связывания параоксона в сайте Садлоу

II (рис. 2Е). Значение distO-P остается стабильным только первые 2000 пс симуляции, затем молекула параоксона отдалается от каталитического тирозина и не возвращается в продуктивную конформацию на протяжении оставшихся 8000 пс. Таким образом, связывание молекулы олеиновой кислоты в сайте FA2 уменьшает вероятность образования новой ковалентной связи, а значит, должен снижать псевдоэстеразную активность альбумина по отношению к параоксоном.

На следующем этапе на основе полученных методом молекулярной динамики траекторий движения атомов были рассчитаны значения свободных энергий ( $\Delta G$ ) образования исследуемых комплексов альбумина с параоксоном (табл.). Как видно из таблицы, связывание молекулы олеиновой кислоты в сайте FA5 практически не влияет на эффективность взаимодействия параоксона с альбумином в сайте Садлоу I, тогда как связывание в сайте FA2 ухудшает эффективность взаимодействия. И наоборот, связывание олеиновой кислоты в сайте FA5 альбумина снижает эффективность взаимодействия с параоксоном в сайте Садлоу II, а связывание в сайте FA2 – не влияет. Такой эффект закономерен, поскольку сайт FA5 находится вблизи сайта Садлоу II, а сайт FA2 – вблизи сайта Садлоу I.

По всей видимости, основной вклад в изменение связывающей способности альбумина вносит отрицательный заряд молекулы олеиновой кислоты. Появление дополнительного отрицательного заряда приводит к перераспределению зарядов на поверхности альбумина и конформационным изменениям сайтов связывания, что, в свою очередь, влияет на эффективность взаимодействия альбумина с параоксоном.

В работе [25] методами равновесного диализа, кругового дихроизма и молекулярного моделирования изучали влияние олеиновой кислоты на взаимодействие альбумина чело-

века с дансил-L-аспарагином (DNSA, лигандом сайта Садлоу I) и ибупрофеном (лигандом сайта Садлоу II). Согласно полученным данным, увеличение концентрации олеиновой кислоты приводило к увеличению аффинности сайта Садлоу I к DNSA (по нашим же данным аффинность к параоксону уменьшалась) и уменьшению аффинности сайта Садлоу II к ибупрофену (как и аффинность к параоксону). Авторы показали, что связывание олеиновой кислоты приводит к изменению конформации сайта Садлоу I и изменению положения молекулы DNSA в этом сайте. В нашем случае мы получили схожий результат: связывание олеиновой кислоты в сайтах FA5 и FA2 влияет на положение параоксона в сайте Садлоу I. Возможно, разная направленность изменения аффинности объясняется различиями в структуре параоксона и DNSA: в молекуле DNSA содержится положительно заряженная гуанидиновая группа, «откликающаяся» на появление отрицательного заряда при связывании молекул олеиновой кислоты.

**Заключение.** Согласно полученным данным, связывание олеиновой кислоты в сайте FA5 не влияет на эстеразную активность альбумина по отношению к параоксону, не влияет на связывающую активность в сайте Садлоу I, не влияет на псевдоэстеразную активность альбумина, но уменьшает связывающую активность в сайте Садлоу II. Связывание олеиновой кислоты в сайте FA2 не влияет

на эстеразную активность белка, уменьшает связывающую активность в сайте Садлоу I, не влияет на псевдоэстеразную активность альбумина, а также не влияет на связывающую активность в сайте Садлоу II. В реальных условиях олеиновая кислота будет связываться и в сайте FA5, и в сайте FA2. Поэтому можно ожидать, что повышенная концентрация ЖК в крови, даже без учета конкуренции за связывание с альбумином в сайтах Садлоу I (FA7) и Садлоу II (FA4), будет снижать вероятность связывания параоксона с альбумином и уменьшать вероятность псевдоэстеразной реакции. Из-за уменьшения связывающей способности альбумина по отношению к ФОС молекулы параоксона с меньшей эффективностью будут транспортироваться к нервно-мышечным и нейрональным синапсам. Полученный результат дополняет данные, представленные в работе [26], согласно которым омега-3 жирные кислоты проявляют защитное действие при отравлении ФОС. Новые данные о возможности биологически активных соединений разных классов модулировать связывающую и эстеразную активность альбумина по отношению к ФОС помогут в дальнейшем выработать рекомендации для усовершенствования антидотной терапии.

Благодарности. Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 18-015-00304) и в рамках госзадания АААА-А18-118012290142-9.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Peter J.V., Jerobin J., Nair A., Bennett A., Samuel P., Chrispal A. et al. Clinical profile and outcome of patients hospitalized with dimethyl and diethyl organophosphate poisoning. *Clin. Toxicol. (Phila)* 2010; 48: 916-23.
- King A.M., Aaron C.K. Organophosphate and carbamate poisoning. *Emerg. Med. Clin. North Am.* 2015; 33: 133-151.
- Sogorb M.A., García-Argüelles S., Carrera V., Vilanova E. Serum albumin is as efficient as paraxonase in the detoxication of paraoxon at toxicologically relevant concentrations. *Chem. Res. Toxicol.* 2008; 21: 1524-9.
- Li B., Nachon F., Froment M.T., Verdier L., Debouzy J.C., Brasme B. et al. Binding and hydrolysis of soman by human serum albumin. *Chem. Res. Toxicol.* 2008; 21: 421-31.
- Goncharov N.V., Belinskaia D.A., Shmurak V.I., Terpilowski M.A., Jenkins R.O., Avdonin P.V. Serum albumin binding and esterase activity: mechanistic interactions with organophosphates. *Molecules* 2017; 22: E1201.
- Гончаров Н.В., Белинская Д.А., Разыграев А.В., Уколов А.И. О ферментативной активности альбумина. *Биоорг. химия* 2015; 41: 131-44.
- Duran M. Disorders of Mitochondrial Fatty Acid Oxidation and Ketone Body Handling. In: Blau N., Duran M., Blaskovics M.E., Gibson K.M., eds. *Physician's Guide to the Laboratory Diagnosis of Metabolic Diseases*. Berlin, Heidelberg: Springer; 2003: 309-34.
- Reichenwallner J., Hinderberger D. Using bound fatty acids to disclose the functional structure of serum albumin. *Biochim. Biophys. Acta.* 2013; 1830(12): 5382-93.
- Dasgupta A., Crossey M.J. Elevated free fatty acid concentrations in lipemic sera reduce protein binding of valproic acid significantly more than phenytoin. *Am. J. Med. Sci.* 1997; 313: 75-9.
- Takamura N., Shinozawa S., Maruyama T., Suenaga A., Otagiri M. Effects of fatty acids on serum binding between furosemide and valproic acid. *Biol. Pharm. Bull.* 1998; 21: 174-6.
- Vorum H., Honore B. Influence of fatty acids on the binding of warfarin and phenprocoumon to human serum albumin with relation to anticoagulant therapy. *J. Pharm. Pharmacol.* 1996; 48: 870-5.
- van der Vusse G.J. Albumin as fatty acid transporter. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 2009; 24(4): 300-7.
- Rizzuti B., Bartucci R., Sportelli L., Guzzi R. Fatty acid binding into the highest affinity site of human serum albumin observed in molecular dynamics simulation. *Arch. Biochem. Biophys.* 2015; 579: 18-25.
- Abraham M.J., Murtola T., Schulz R., Páll S., Smith J.C., Hess B. et al. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*. 2015; 1-2: 19-25.
- Berendsen H.J.C., Postma J.P.M., van Gunsteren W.F., Hermans J. Interaction models for water in relation to protein hydration. In: Pullman B., ed. *Intermolecular forces*. Dordrecht: Reidel D. Publishing Company; 1981: 331-42.
- Bussi G., Donadio D., Parrinello M. Canonical sampling through velocity rescaling. *J. Chem. Phys.* 2007; 126: 014101.
- Berendsen H.J.C., Postma J.P.M., di Nola A., van Gunsteren W.F., Haak J.R. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J. Chem. Phys.* 1984; 81: 3684-90.
- Darden T., York D., Pedersen L. Particle mesh Ewald: An N log(N) method for Ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys.* 1993; 3: 10089-92.
- Hess B., Bekker H., Berendsen H.J.C., Fraaije J.G.E.M. LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. *J. Comp. Chem.* 1997; 8: 1463-73.
- Genheden S., Ryde U. The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities. *Expert Opin. Drug Discov.* 2015; 10: 449-61.
- Kumari R., Kumar R. Open Source Drug Discovery Consortium, Lynn A. g\_mmpbsa - a GROMACS tool for high-throughput MM-PBSA calculations. *J. Chem. Inf. Model.* 2014; 54: 1951-62.
- Белинская Д.А., Таборская К.И., Авдонин П.В., Гончаров Н.В. Модуляция жирными кислотами сайтов взаимодействия альбумина с параоксоном: анализ методами молекулярного моделирования. *Биоорг. химия* 2017; 43: 347-56.
- Белинская Д.А., Шмурак В.И., Таборская К.И., Авдонин П.П., Авдонин П.В., Гончаров Н.В. Сравнительный анализ in silico связывания параоксона сывороточным альбумином человека и быка. *ЖЭБФ* 2017; 53: 170-7.
- Jacob R.B., Michaels K.C., Anderson C.J., Fay J.M., Dokholyan N.V. Harnessing Nature's Diversity: Discovering organophosphate bioscavenger characteristics among low molecular weight proteins. *Sci. Rep.* 2016; 6:37175.
- Avci B., Bilge S.S., Arslan G., Alici O., Darakci O., Baratzada T. et al. Protective effects of dietary omega-3 fatty acid supplementation on organophosphate poisoning. *Toxicol. Ind. Health.* 2018; 34(2): 69-82.

## REFERENCES:

1. Peter J.V., Jerobin J., Nair A., Bennett A., Samuel P., Chrispal A. et al. Clinical profile and outcome of patients hospitalized with dimethyl and diethyl organophosphate poisoning. *Clin. Toxicol. (Phila)* 2010; 48: 916-23.
2. King A.M., Aaron C.K. Organophosphate and carbamate poisoning. *Emerg. Med. Clin. North Am.* 2015; 33: 133-151.
3. Sogorb M.A., Garcia-Argüelles S., Carrera V., Vilanova E. Serum albumin is as efficient as paraxonase in the detoxication of paraoxon at toxicologically relevant concentrations. *Chem. Res. Toxicol.* 2008; 21: 1524-9.
4. Li B., Nachon F., Froment M.T., Verdier L., Debouzy J.C., Brasme B. et al. Binding and hydrolysis of soman by human serum albumin. *Chem. Res. Toxicol.* 2008; 21: 421-31.
5. Goncharov N.V., Belinskaia D.A., Shmurak V.I., Terpilowski M.A., Jenkins R.O., Avdonin P.V. Serum albumin binding and esterase activity: mechanistic interactions with organophosphates. *Molecules* 2017; 22: E1201.
6. Goncharov N.V., Belinskaia D.A., Ukolov A.I., Razygraev A.V. On the enzymatic activity of albumin. *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2015; 41: 131-44 (in Russian).
7. Duran M. Disorders of Mitochondrial Fatty Acid Oxidation and Ketone Body Handling. In: Blau N., Duran M., Blaskovics M.E., Gibson K.M., eds. *Physician's Guide to the Laboratory Diagnosis of Metabolic Diseases*. Berlin, Heidelberg: Springer; 2003: 309-34.
8. Reichenwallner J., Hinderberger D. Using bound fatty acids to disclose the functional structure of serum albumin. *Biochim. Biophys. Acta.* 2013; 1830(12): 5382-93.
9. Dasgupta A., Crossey M.J. Elevated free fatty acid concentrations in lipemic sera reduce protein binding of valproic acid significantly more than phenytoin. *Am. J. Med. Sci.* 1997; 313: 75-9.
10. Takamura N., Shinozawa S., Maruyama T., Suenaga A., Otagiri M. Effects of fatty acids on serum binding between furosemide and valproic acid. *Biol. Pharm. Bull.* 1998; 21: 174-6.
11. Vorum H., Honore B. Influence of fatty acids on the binding of warfarin and phenprocoumon to human serum albumin with relation to anticoagulant therapy. *J. Pharm. Pharmacol.* 1996; 48: 870-5.
12. van der Vusse G.J. Albumin as fatty acid transporter. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 2009; 24(4): 300-7.
13. Rizzuti B., Bartucci R., Sportelli L., Guzzi R. Fatty acid binding into the highest affinity site of human serum albumin observed in molecular dynamics simulation. *Arch. Biochem. Biophys.* 2015; 579: 18-25.
14. Abraham M.J., Murtola T., Schulz R., Páll S., Smith J.C., Hess B. et al. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX.* 2015; 1-2: 19-25.
15. Berendsen H.J.C., Postma J.P.M., van Gunsteren W.F., Hermans J. Interaction models for water in relation to protein hydration. In: Pullman B., ed. *Intermolecular forces*. Dordrecht: Reidel D. Publishing Company; 1981: 331-42.
16. Bussi G., Donadio D., Parrinello M. Canonical sampling through velocity rescaling. *J. Chem. Phys.* 2007; 126: 014101.
17. Berendsen H.J.C., Postma J.P.M., di Nola A., van Gunsteren W.F., Haak J.R. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J. Chem. Phys.* 1984; 81: 3684-90.
18. Darden T., York D., Pedersen L. Particle mesh Ewald: An N<sup>3</sup>log(N) method for Ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys.* 1993; 3: 10089-92.
19. Hess B., Bekker H., Berendsen H.J.C., Fraaije J.G.E.M. LINDS: A linear constraint solver for molecular simulations. *J. Comp. Chem.* 1997; 8: 1463-73.
20. Genheden S., Ryde U. The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities. *Expert Opin. Drug Discov.* 2015; 10: 449-61.
21. Kumari R., Kumar R. Open Source Drug Discovery Consortium, Lynn A. g\_mmpbsa – a GROMACS tool for high-throughput MM-PBSA calculations. *J. Chem. Inf. Model.* 2014; 54: 1951-62.
22. Belinskaia D.A., Taborskaya K.I., Goncharov N.V., Avdonin P.V. Modulation of the albumin-paraoxon interaction sites by fatty acids: analysis by the molecular modeling methods. *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2017; 43: 359-67.
23. Belinskaia D.A., Taborskaya K.I., Goncharov N.V., Shmurak V.I., Avdonin P.P., Avdonin P.V. In silico analysis of paraoxon binding by human and bovine serum albumin. *J. Evol. Biochem. Physiol.* 2017; 53: 191-9. (in Russian)
24. Jacob R.B., Michaels K.C., Anderson C.J., Fay J.M., Dokholyan N.V. Harnessing Nature's Diversity: Discovering organophosphate bioscavenger characteristics among low molecular weight proteins. *Sci. Rep.* 2016; 6:37175.
25. Yamasaki K., Hyodo S., Taguchi K., Nishi K., Yamaotsu N., Hirono S. et al. Long chain fatty acids alter the interactive binding of ligands to the two principal drug binding sites of human serum albumin. *PLoS One* 20179; 12(6): e0180404.
26. Avci B., Bilge S.S., Arslan G., Alici O., Darakci O., Baratzada T. et al. Protective effects of dietary omega-3 fatty acid supplementation on organophosphate poisoning. *Toxicol. Ind. Health.* 2018; 34(2): 69-82.

D.A. Belinskaia<sup>1</sup>, A.A. Batalova<sup>1</sup>, N.V. Goncharov<sup>1,2</sup>

## EFFECTS OF FATTY ACIDS ON BINDING AND ESTERASE ACTIVITY OF ALBUMIN TOWARDS ORGANOPHOSPHORUS COMPOUNDS ACCORDING TO MOLECULAR MODELING APPROACH

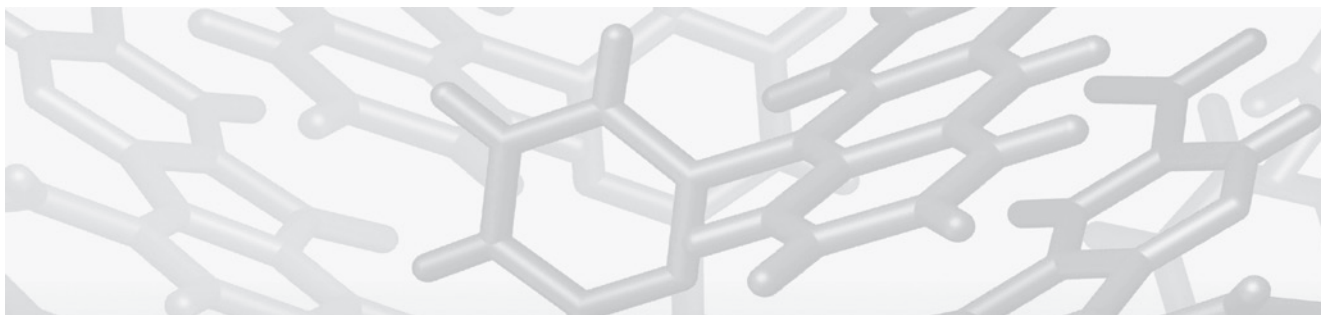
<sup>1</sup>I.M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Science, 194223, Saint Petersburg, Russian Federation

<sup>2</sup>Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology, 188663, p.o. Kuz'molovsky, Leningrad Region, Russian Federation

One of the urgent tasks of clinical toxicology is the development of therapy aimed at stoichiometric and/or catalytic detoxification of organophosphorus compounds in the bloodstream, which will prevent the poison's entering the neuromuscular and neuronal synapses and help to avoid irreversible consequences of poisoning. An auxiliary option for the detoxification of organophosphorus compounds in the bloodstream may be a directed effect on albumin, the main transport protein of the blood, by means of molecules modulating its binding and/or esterase properties. The aim of the present study is to evaluate the effect of fatty acids on the binding and esterase activity of human albumin to organophosphorus compounds by molecular modeling methods on the example of paraoxone and oleic acid. According to the data obtained, an increased concentration of fatty acids in the blood reduces the likelihood of paraoxon binding to albumin and pseudo-esterase reaction.

**Keywords:** human serum albumin, organophosphorus compounds, fatty acids, molecular modeling.

Материал поступил в редакцию 23.04.2019 г.





УДК 573 : 615.27

# МОДЕЛЬНЫЕ БИОМЕМБРАНЫ, КАК ТЕСТ-ОБЪЕКТЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИОННЫХ ДИАПАЗОНОВ ВРЕДНЫХ ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ СРЕДАХ И ОБЪЕКТАХ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ

О.М. Алексеева<sup>1</sup>, А.В. Кременцова<sup>1</sup>,  
А.В. Кривандин<sup>1</sup>, О.В. Шаталова<sup>1</sup>,  
Ю.А. Ким<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБУН Институт биохимической физики РАН  
им. Н.М. Эммануэля, 119334, г. Москва,  
Российская Федерация

<sup>2</sup>ФГБУН Институт биофизики клетки  
Российской академии наук, Федерального  
государственного бюджетного учреждения  
науки «Федеральный исследовательский  
центр «Пушинский научный центр  
биологических исследований Российской  
академии наук», 142290, г. Пушино,  
Московская область, Российская Федерация

**В** работе представлены данные по изменениям модельных биомембран (липосомы, тени эритроцитов, эритроциты), используемых, как тест-объекты, для определения тех областей концентраций биологически активных веществ, в которых не происходит нарушения структуры или функции экспериментальных объектов. В качестве биологически активных веществ отобрали синтетические: регулятор роста растений - мелафен, применяемый в малых дозах в предпосевной обработке семян и производные антиоксиданта – фенозана, феноксан и ИХФАНЫ. Показали методом ДСК, что производные фенозана в концентрациях равных  $10^{-5}$  М и более, разрушают микродоменную организацию в бислоях фосфолипидных мультиламеллярных липосом и переформируют белковые микродомены в тенях эритроцитов. Мелафен в малых и больших концентрациях полимодально изменяет микродоменную организацию в бислоях фосфолипидных мультиламеллярных липосом, не разрушая структуру, не влияет на белковые микродомены в тенях. Спектральным анализом выявили увеличение проницаемости мембран в изолированных целых эритроцитах при действии мелафена в больших и малых концентрациях. Методом малоуглового дифракционного рассеяния показали отсутствие влияния мелафена в широком диапазоне концентраций на толщину фосфолипидных бислоев и порядок их упаковки в мультиламеллярных липосомах.

**Ключевые слова:** фосфолипиды, мультиламеллярные липосомы, биологически активные вещества, тени эритроцитов, эритроциты, ДСК, малоугловое дифракционное рассеяние.

**Введение.** Необходимость определения концентрационных ограничений при применении биологически активных веществ (БАВ) вызвана тем, что использование в «терапевтических» концентрациях, обычно миллимолярных и более, вызывает и побочные эффекты. Отслеживание на клеточном и субклеточном уровне мишеней и механизмов действия БАВ может позволить предупредить негативное влияние. На примере син-

тетических БАВ: регулятора роста растений гидрофильного мелафена [1] и производных антиоксиданта фенозана: его калиевой соли – гидрофильного феноксана, и гидрофобизованных ИХФАНов [2,3], было исследовано действие БАВ в широком диапазоне концентраций (разведений) на структуру и функции модельных и биологических экспериментальных объектов разного уровня организации.

**Алексеева Ольга Михайловна (Alekseeva Olga Michailovna)**, старший научный сотрудник ФГБУН Института биохимической физики им. Н.М. Эммануэля РАН, [olgavek@yandex.ru](mailto:olgavek@yandex.ru)

**Кременцова Анна Владимировна (Krementsova Anna Vladimirovna)**, кандидат физ. мат. наук, старший научный сотрудник ФГБУН Института биохимической физики им. Н.М. Эммануэля РАН, [akrementsova@mail.ru](mailto:akrementsova@mail.ru)

**Шаталова Ольга Владимировна (Shatalova Olga Vladimirovna)**, научный сотрудник Центра рентгенодифракционного анализа ФГБУН Института биохимической физики им. Н.М. Эммануэля РАН, [Shatalova@sky.chph.ras.ru](mailto:Shatalova@sky.chph.ras.ru)

**Кривандин Алексей Владимирович (Krivandin Aleksey Vladimirovich)**, кандидат физ. мат. наук, ведущий научный сотрудник, руководитель Центра рентгенодифракционного анализа ФГБУН Института биохимической физики РАН, [krivandin@sky.chph.ras.ru](mailto:krivandin@sky.chph.ras.ru)

**Ким Юрий Александрович (Kim Yuri Alexandrovich)**, доктор физ. мат. наук, ведущий научный сотрудник Института биофизики клетки РАН, ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Пушинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»

В качестве первых наиболее простых липидных модельных мембранных объектов использовались фосфолипидные мультиламеллярные липосомы [4]. Устойчивые липосомы в виде взвеси в фосфатном буфере были сформированы или из синтетического индивидуального фосфолипида димиристоилфосфатидилхолина (ДМФХ), или из смеси природных фосфолипидов – яичного лецитина. Мультиламеллярных липосомы формировали с единообразным фосфолипидным составом для того, чтобы исследовать методом ДСК влияние БАВ на структурном уровне микродоменов. Тестирование влияния БАВ на следующем структурном уровне – организации упаковки бислоев в многослойной липосоме и толщинах этих бислоев, проводили методом МУРР в взвеси мультиламеллярных липосомы, состоящих из упорядоченной смеси природных фосфолипидов. Схематическая структура фосфолипидных мультиламеллярных липосом показана на рисунке 1. Как модель мультиламеллярные липосомы отражают многослойное строение или взаимное расположение внутриклеточных органелл (митохондрий, аппарата Гольджи, ядерной оболочки, эндоплазматического ретикулума, плазмалеммы).

Необходимо отметить, что, так как в исследовании использовались БАВ разной природы: гидрофобные ИХФАНЫ и гидрофильные феноксан и мелафен, то мы обосновали насыщение всей структуры мультиламеллярной липосомы этими веществами, основываясь на работах Антонова В.Ф. с соавторами [5], в которых было показано образование нанопор при определенных структурных состояниях бислоя.

По данным электронной микроскопии и ДСК известно, что в фосфолипидном бислое, состоящем только из ДМФХ, во временном и температурном промежутке между эндотермическими фазовыми переходами: предпереходом и основным фазовым переходом, существует риппл-фаза [6]. Предпереход – это неярко выраженный одиночный пик на кривых плавления в области 14-15°C, при котором происходит перестройка упорядоченной упаковки фосфолипидов в гель-фазе в риппл-фазу (рифленую фазу). При повышении температуры до 24,3°C достигается основной фазовый переход ДМФХ – это одиночный пик с большой амплитудой, отражающий кооперативную перестройку в менее упорядоченное состояние – фазу жидкого кристалла. Методом электронной микроскопии риппл-фазу наблюдали для ДМФХ и ДПФХ (дипальмитоилфосфатидилхолина) с характерным для каждого вида липидов периодом волнистости. Периодичность волнистости и ее амплитуда меняется в зависимости от факторов, влияющих на бислой [6]. С точки зрения воздействия БАВ на мембраны риппл-фаза представляет большой

интерес, т.к. в этот период сосуществуют фосфолипидные микродомены, находящиеся в состоянии гель-фазы и микродомены – в состоянии жидкого кристалла. Это и обуславливает рифленую картину при электронной микроскопии. На стыке между микродоменами образуются короткоживущие гидрофильные наноразмерные поры [5], через которые гидрофильное вещество проникает ко всем внутренним липосомам, составляющим мультиламеллярную липосому (рис.1). Гидрофобные вещества накапливаются в гидрофобных областях бислоев. Поэтому влияние БАВ на липидный бислой в настоящей работе тестировали методом ДСК по изменениям параметров пика основного фазового перехода ДМФХ.

В максимуме основного фазового перехода при 24,3°C, по площади пика определяется теплоемкость эндотермического пика, на полувысоте пика определяется полуширина – величина, обратная кооперативности перехода. В присутствии БАВ максимум перехода может сдвигаться по температурной шкале, что свидетельствует о влиянии БАВ на бислой, также и другие параметры могут быть изменены. Экспериментальный объект и ДСК метод в случае тестирования ДМФХ липосом – это адекватная модель для исследования действия БАВ на липидную составляющую биомембран. БАВ могут оказывать существенное влияние на липидный бислой, изменяя параметры фазовых переходов липидов, что указывает на локализацию БАВ в бислое, и позволяет предположить механизмы взаимодействия с липидами. Плавление бислоя в нашей работе происходит при физиологических температурах.

Итак, во время риппл-фазы происходит нарушение регулярности структуры (нарушение дальнего порядка) – одновременно с микродоменами, находящимися в состоянии жидкого кристалла, имеются и микродомены в состоянии гель-фазы. Между этими разнородными микродоменами образуются короткоживущие нанопоры с гидрофильными каналами [5]. В результате малые гидрофильные молекулы проникают во все внутренние водные прослойки мультиламеллярной липосомы и могут оказывать на бислои поверхностное влияние. Гидрофобные вещества насыщают гидрофобные области каждого бислоя. В результате БАВ, действуя снаружи бислоев и внутри, изменяют параметры во всей многослойной липосоме. По ДСК параметрам кривых плавления индивидуального фосфолипида с ярко выраженным пиком основного фазового перехода при воздействии БАВ, добавленного в разных концентрациях, четко выявляется доза-зависимая способность вещества встраиваться в фосфолипидный бислой или же действовать с поверхности бислоя. При определенных концентрациях либо разрушается микродоменная структура бислоя,

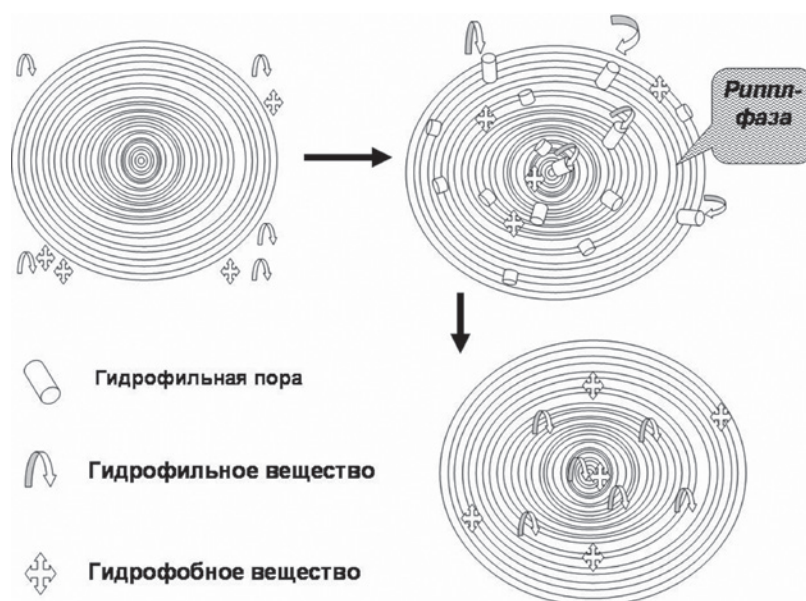
либо укрепляется для противодействия различным факторам внешней среды.

Исследования влияния БАВ на липидные бислои проводятся уже достаточно давно. Актуальность таких исследований обосновал Харакоз Д.П. [7]. В этой работе рассматривалась возможная физиологическая роль фазового перехода «жидкое-твёрдое» в биологических мембранах. По-видимому, сдвиг температуры тела животного при гибернации или обычном сне вызывает перестройки микродоменов в бислоиных мембранах, что способствует упорядочиванию состава и структуры биомембран. Задача многочисленных работ по исследованию влияния БАВ на биомембраны состоит в выявлении возможностей регуляции фазового перехода «жидкое-твёрдое». В мембране, находящейся в состоянии жидкого кристалла, ее белковые компоненты (ионные каналы, ионные обменники, ионные насосы, рецепторы, ферменты) конформационно подвижны, и их функции могут быть активированы. При твёрдом состоянии мембраны функции белков угнетены. Необходимо отметить, что термограммы фазового перехода в мембранах, состоящих из единственного фосфолипида, имеют четко выраженные предпереход и основной переход. Поэтому достаточно просто определять воздействие БАВ на термоиндуцированные параметры липидного бислоя. Методом ДСК в мультислойных фосфолипидных липосомах отслеживают влияние БАВ разной природы на организацию и перестройки микродоменов.

Для тестирования методом МУРР следующего организационного уровня эксперименталь-

ных объектов были использованы липосомы, содержащие смесь фосфолипидов. В состав мультислойных липосом, сформированных из яичного лецитина, входят природные фосфолипиды: фосфодитилхолин, фосфатидилэтанолламин и в малых количествах фосфатидилинозитол и сфинголипиды. Их молекулы различны по строению и составу. Они содержат полярные группы: холин, этаноламин, инозит, а также жирнокислотные остатки разной величины и степени насыщенности. С точки зрения адекватности модели отметим, что такие фосфолипиды имеются практически во всех мембранах клеток животного происхождения. Необходимо отметить, что именно наличие заряда, длина молекул и их насыщенность позволяет образовывать мозаичную мембрану. Это играет основную роль в стабилизации клеточных мембран, их структурной целостности и обеспечении функционирования мембранных компонентов. В клетках молекулы, составляя бислои, взаимно располагаются соответственно своим стереоспецифическим характеристикам, осуществляя белок-липидные взаимодействия. Так, для активной работы интегрированных и ассоциированных мембранных белков: рецепторов, каналов, ионных обменников, насосов и ферментов, необходим определенный состав липидного окружения этих белковых структур.

Температуры плавления природных фосфолипидов в сложной смеси в значительной степени перекрываются, выделить отдельные индивидуальные пики можно только с помощью математических методов, что может и не отражать ре-



**Рис. 1.** Схема строения мультислойных липосом, сформированных из фосфолипидов. Во время «риплл-фазы» образуются наноразмерные гидрофильные поры [5], и гидрофильные БАВ проникают к поверхности всех бислоиных липосом в составе мультислойных липосом. Гидрофобные БАВ насыщают бислои, встраиваясь среди фосфолипидов.

ального структурного состояния микродоменов. Домены могут быть смешанными по составу. БАВ, встраиваясь или разрушая, будут влиять на состав микродоменов. При плавлении из-за разной стереоспецифичности липиды проявляют разную способность к латеральной диффузии и «флип-флоп»-перескокам в листках бислоев [8,9].

Картина термограмм при ДСК плавлении получится сложная, и количественная обработка и интерпретация будут затруднены. Поэтому нами был использован один из методов рентгенодифракционного анализа – малоугловое рентгеновское рассеяние МУРР [10]. Этот метод позволяет, проведя анализ измеренной интенсивности малоуглового рентгеновского рассеяния суспензией многослойных липосом, получить информацию о пространственной структуре липидных мембран и характере их взаимного расположения (укладке) в мультиламеллярных липосомах. Есть возможность определить механизм влияния БАВ по разрыхлению и уширению бислоев или уплотнению и сужению толщин бислоев, а также изменению пространства между бислоями. Это важно, т.к. в процессе жизнедеятельности клеток происходит слияние мембран, образование перемычек, разрыв и расхождение мембран [6]. Соответственно БАВ могут выступать в роли регуляторов этих процессов.

Для тестирования влияния БАВ на белок-липидные взаимодействия были использованы модели биомембран на следующем организационном уровне – тени эритроцитов. Это замкнутые оболочки эритроцитов, лишенные гемоглобина, но содержащие весь цитоскелет [11-13]. Если модели мультиламеллярных фосфолипидных липосом имитируют структуры клеточных органелл, то тени эритроцитов отражают основные элементы клетки – оболочку и цитоскелет. Для тестирования влияния БАВ на такой модели также применили метод ДСК, но с другими параметрами. Кривые эндотермических термограмм при прогревании взвеси теней эритроцитов показывают характеристики термоиндуцированной денатурации всех белковых микродоменов. Отражается влияние БАВ на перестройку ионных каналов, их компонентов и структурных белков. БАВ либо усиливают устойчивость к денатурации, либо ослабляют. В работах Акоев V.R. с соавторами [14] были обнаружены перестройки в белковых микродоменах теней эритроцитов человека при оксидативном стрессе, характерном для многих патологий. По-видимому, ДСК тестирование мембран и цитоскелета эритроцитов может помочь в диагностике.

Следующую ступень усложнения организации экспериментального объекта обеспечили изолированные клетки. Моделью были целые, полу-

ченные из кровяного русла, эритроциты. Ранее в работах Генделя Л.Я. с соавторами [15] было показано, что под влиянием синтетического антиоксиданта фенозана происходят изменения поверхностной архитектоники эритроцитов. При этом антиоксидант встраивается преимущественно в верхний листок бислоя и меняет морфологию эритроцитов. В работах Бурлаковой Е.Б. с соавторами [16] подтверждено не только воздействие фенозана на структурные свойства – микровязкость мембран, но и влияние на биохимические свойства ферментов. В настоящей работе, учитывая эти данные по модификации мембраны, провели исследование влияния БАВ на целостность мембраны эритроцитов. Ее оценивали по проницаемости мембраны, характеризующейся степенью утечки гемоглобина из эритроцитов [17].

В настоящей работе все исследования воздействий биологически активных веществ: мелафена и производных фенозана, проводились в широком диапазоне концентраций. Такой подход к исследованиям был обусловлен тем, что необходимость исследований малых доз (концентраций или разведений, если нельзя точно определить) достаточно актуальна. Известно, что гидрофобные вещества, добавленные к экспериментальным объектам в малых концентрациях, накапливаются в гидрофобных областях мембран и в гидрофобных карманах белков до средних и больших концентраций. Во многих случаях БАВ не выводятся из организма, и далее могут возникать побочные эффекты. Гидрофильные БАВ также могут накапливаться в гидратных областях. Кроме того, происходит метаболизм или катаболизм БАВ в организме животных. В работах Прокопова А.А. и соавторов [18] при изучении метаболизма адаптогена фенозан-кислоты в организме кроликов обнаружено, что фенозан расщепляется на 2 метаболита, обладающих большей гепатопротекторной способностью, чем исходное вещество. Как показано в работах Бурлаковой Е.Б. с соавторами [19] репарация повреждений, нанесенных малыми дозами, как БАВ, так и радиации, может не активироваться, что представляет дальнейшую опасность. В итоге на основании перечисленных выше обоснований использования экспериментальных моделей, и тестирования влияния биологически активных веществ указанными методами *целью настоящей работы* явилось определение концентрационных границ для применения биологически активных веществ без деструкции биологических объектов.

**Материалы и методы исследования.** ДМФХ – димиристоилфосфатидилхолин, яичный лецитин (Sigma); NaCl, KCl,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , (Sigma); мелафен – меламинавая соль бис (оксиметил) фосфиновой кислоты, синтезирован в ИОФХ РАН им. А.Е. Арбузова; феноксан – калиевая соль фе-

нозана –  $\beta$ -(4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилфенил) пропионовая кислота, синтезирована в ИХФ РАН им. Н.Н. Семенова; ИХФАНЫ – сложноэфирные производные (метилокса) (3,5 дитрет бутил - 4-гидроксифенилпропановой кислоты) и этаноламина (коламина), замещенного алкильными заместителями с разной длиной цепи 8; 10; 12; 16 углеродных атомов, синтезированы в ИБХФ РАН им. Н.М. Эмануэля.

*Приготовление многослойных везикул.* Для приготовления водной дисперсии многослойных везикул из ДМФХ (0,2-0,3 мМ) использовали фосфолипид и хлороформ без дополнительной очистки согласно методу, предложенному McMullen T.P.W. [20]. Для получения липосом ДМФХ растворяли в хлороформе 1 мг/мл, под аргоном высушивали до состояния тонкой пленки на стенках колбы. На 12 часов для полного удаления растворителя колбу помещали под вакуум. Затем добавляли 10мМ фосфатный буфер рН 7,4 и 60 мин нагревали на водяной бане при температуре выше фазового перехода (45-50° С), и 30 мин при комнатной температуре гидратировали на шейкере. По данным электронной микроскопии полученные липосомы имеют мультиламеллярную структуру и достигают размеров до 2000 [4].

*Приготовление водных растворов и суспензий биологически активных веществ.* Водные растворы БАВ: мелафена или феноксана, в широком диапазоне концентраций ( $10^{-17}$ - $10^{-2}$  М) приготавливали методом последовательных разбавлений с интенсивным перемешиванием с помощью вортекса. Суспензии ИХФАНов приготавливали также методом последовательных разбавлений с интенсивным перемешиванием с помощью вортекса. Исходный концентрированный раствор ИХФАНов готовили в этаноле. Перед измерениями раствор БАВ добавляли в образец сравнения, содержащий фосфатный буфер, образец вносили в контрольную ячейку. Для приготовления экспериментального образца раствор БАВ добавляли в приготовленную дисперсию ДМФХ до необходимого молярного соотношения. Затем образец вносили в ячейку для измерения.

*Получение эритроцитов и теней эритроцитов* проводилось по методам дифференциального центрифугирования с соблюдением температурного режима [11-15].

*Измерение выхода гемоглобина* проводилось спектрофотометрическим методом [21].

*Микрокалориметрическое исследование.* Температурная зависимость избыточного удельного теплопоглощения экспериментальных модельных объектов отражалась в виде кинетической кривой – термограммы. Термограммы водных дисперсий многослойных везикул, сформированных из ДМФХ, регистрировали на дифференциальном адиабатном сканирующем микрокалори-

метре ДАСМ-4 (Специальное Конструкторское Бюро АН СССР, г. Пущино). Устройство, принцип работы и основные характеристики ДАСМ-4 описаны в работах Privalov P.L., Plotnikov V.V. [22]. Измерительная и сравнительная ячейки выполнены из платины и имеют объем 0,47 мл. Все измерения проведены в фосфатном буфере при скорости прогрева 1 град/мин. При модификации ДСК метода скорости прогрева составляли 0,125 град/мин; 0,25 град/мин; 0,5 град/мин; 1 град/мин. Уровень шума не превышал 30 мДж/К, воспроизводимость базовой линии 160 мДж/К.

Температурную зависимость избыточного молярного теплопоглощения (термограммы) каждого образца водной суспензии многослойных везикул, сформированных из ДМФХ в смеси с БАВ регистрировали в режиме цикла не менее трех раз. Аналогично проводили регистрацию термоиндуцированной денатурации белковых микромоменов в суспензии теней эритроцитов. Мелафен и феноксан добавляли к теням, ИХФАН-10 добавляли в процессе получения препарата теней из эритроцитов.

Анализ термограмм проводили с помощью программного пакета MicroCal Origin 5 («Microcal Software», Northampton, MA). Относительную удельную энтальпию мембран (DHcal) определяли после вычитания базовой линии путем сравнения нормированной на концентрацию мембран площади под термограммой образца (от 10° до 90 °С) с площадью электрической калибровочной метки прибора. Для получения базовой линии обе ячейки (измерительную и сравнительную) заполняли раствором, в котором в дальнейшем проводили измерение мембран, и проводили запись. Относительную интенсивность перехода определяли как величину удельной теплоемкости ( $DCr_{max}$ ) в максимуме пика теплопоглощения при соответствующей температуре максимума ( $T_{max}$ ). Относительную молярную энтальпию фазовых переходов многослойных везикул из ДМФХ и теней эритроцитов (DH), интенсивность переходов ( $DCr_{max}$ ), температуру максимумов ( $T_{max}$ ) и полуширины (DT1/2) переходов определяли, по методу Акоева В.Р. [14].

*Рентгеновское дифракционное исследование* липосом проводили на автоматизированном рентгеновском малоугловом дифрактометре с линейным координатным детектором, изготовленном на основе конструкции малоуглового рентгеновского дифрактометра АМУР-К (Институт кристаллографии РАН) [23]. Дифрактограммы регистрировали при комнатной температуре (21-22°С). Дисперсию липосом помещали в тонкостенный стеклянный капилляр. Источником рентгеновского излучения служила трубка БСВ29Cu с Ni-фильтром. Рентгеновский пучок фокусировался стеклянным зеркалом по схеме

Франкса и коллимировался при помощи щелей. Для учета вклада фонового рассеяния измеряли рассеяние капилляром с буфером без липосом. Для капилляра с дисперсией липосом и для капилляра с буфером были измерены коэффициенты поглощения рентгеновского излучения. Эти коэффициенты в пределах точности эксперимента имели одинаковые значения. Для определения «чистого» рассеяния липосомами из экспериментальных интенсивностей рассеяния капилляром с дисперсией липосом вычитали интенсивность рассеяния капилляром с буфером. Затем вводили коллимационную поправку на высоту рентгеновского пучка и ширину приемного окна детектора. Дифрактограммы представляли в виде функций от модуля дифракционного вектора  $S = (2\sin\theta)/\lambda$ , где  $\lambda$  – длина волны рентгеновского излучения (0.154 нм для  $\text{CuK}\alpha$ ),  $\theta$  – половина угла рассеяния. Период повторяемости мембран в липосомах  $D$  определяли по формуле Вульфа-Брэгга  $D = \lambda/(2\sin\theta_{max})$ , где  $\theta_{max}$  – половина угла рассеяния, соответствующего положению первого дифракционного максимума.

Профиль электронной плотности мембран  $\rho(x)$  в направлении перпендикулярном плоскости мембран рассчитывали преобразованием Фурье по интегральным интенсивностям дифракционных максимумов на дифрактограммах липосом (после введения коллимационной поправки) по формуле:

$$(1) \quad \rho(x) = \sum_{h=1}^N S(h)h\sqrt{I(h)} \cos\left(\frac{2\pi kh}{D}\right),$$

где  $h$  – номер дифракционного максимума,  $S(h)$  и  $I(h)$  – фазовый знак (+ или –) и интегральная интенсивность дифракционного максимума с номером  $h$ ,  $N$  – число дифракционных максимумов. Множитель  $h$  в формуле (1) является поправкой в интенсивность дифракционных максимумов, связанной с разориентацией мембран в дисперсии липосом (фактор Лоренца) [10]. Дифрактограммы каждого образца водной суспензии многослойных везикул, сформированных из яичного лецитина с добавлением БАВ, регистрировали не менее трех раз.

**Результаты и обсуждение.** На основании перечисленных во введении предпосылок были выполнены исследования воздействия БАВ – мелафена и производных фенозана, на модельные биообъекты животного происхождения. Экспериментальные объекты можно расположить в ряд по степени усложнения структуры: мультиламеллярные фосфолипидные липосомы, сформированные из индивидуального синтетического фосфолипида – димиристоилфосфатидилолин (ДМФХ); мультиламеллярные фосфолипидные липосомы, сформированные из смеси природных фосфолипидов – яичного лецитина; тени эритро-

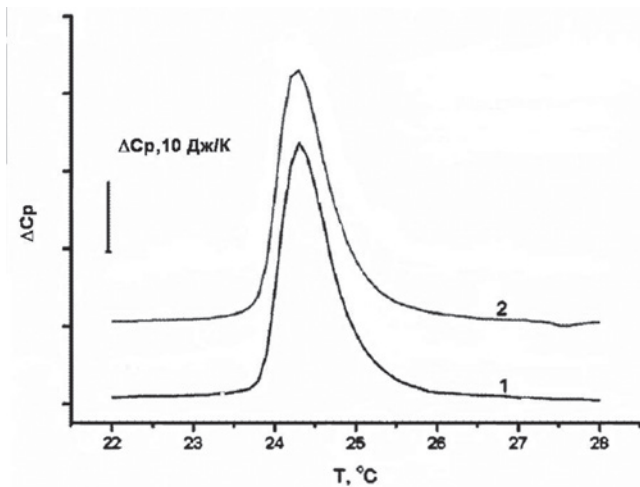
цитов; эритроциты. Для выяснения границ концентрационных диапазонов для БАВ, в которых применение не вызывает разрушения структуры экспериментальные объекты, тестирование проводили используя широкий концентрационный диапазон этих экзогенных веществ.

*Исследование воздействия БАВ – мелафена и производных фенозана, на мембраны с использованием первой модели – мультиламеллярных липосом, сформированных из ДМФХ.* Изменение термоиндуцированных параметров фосфолипидных мультиламеллярных липосом при действии БАВ отражается на термограммах плавления ДМФХ. В зависимости от концентрации применяемого вещества может выявляться сдвиг по температуре максимума основного эндотермического фазового перехода, изменяться амплитуда пика и происходить его уширение или сужение.

При регистрации ДСК термограмм плавления ДМФХ в присутствии мелафена в большой концентрации  $10^{-5}$  М было обнаружено, что пик основного эндотермического фазового перехода остается единственным, по сравнению с контрольной термограммой добавочных пиков не появляется (рис. 2). Это указывает на то, что все бислои в многослойной липосоме претерпели изменения, и мелафен проник ко всем слоям мультиламеллярных липосом. Однако параметры термоиндуцированных основных переходов практически не различаются. Возможно, что мелафен в использованной концентрации не оказал влияния на микроомную организацию бислоев ДМФХ.

Для выявления вероятного воздействия мелафена на структуру ДМФХ фосфолипидных мембран в мультиламеллярных липосом была применена модификация ДСК метода. Помимо стандартного измерения в фосфатном буфере при скорости прогрева 1 град/мин были проведены измерения при разных скоростях плавления. При этом скорости прогрева ячеек с контрольным и опытными образцами составляли 0,125 град/мин; 0,25 град/мин; 0,5 град/мин; 1 град/мин. Таким образом, устойчивую структуру бислоев можно вывести из состояния равновесия. Снижение скорости подачи тепла к ячейкам с контрольным и опытным образцами значительно меняет параметры основного термоиндуцированного фазового перехода ДМФХ. По-видимому, релаксационные процессы в этом случае происходят по-разному. Действительно, и в контрольных образцах суспензией ДМФХ в буферном растворе в отсутствии БАВ были отмечены изменения. При уменьшении скорости подачи тепла к ячейкам значительно снижается энтальпия, незначительно – температура фазового перехода, кооперативность незначительно увеличивается.

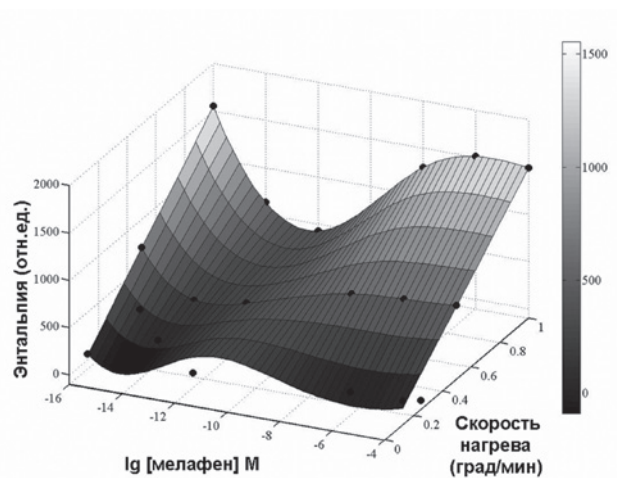
Изменив параметры плавления, мы выявили, что поверхностное воздействие мелафена меняет



**Рис. 2.** Влияние мелафена на структуру фосфолипидных мембран в мультиламеллярных липосомах. Термограммы плавления ДМФХ мультиламеллярных липосом. Основной термоиндуцированный эндотермический фазовый переход. Обозначения: 1 – контроль, 2 –  $10^{-5}$  М. Все измерения проведены в фосфатном буфере при скорости прогрева 1 град/мин.

термоиндуцированные параметры бислоев ДМФХ. В этом случае измерения провели, применяя разведения мелафена в широком диапазоне концентраций от  $10^{-4}$  М до  $10^{-16}$  М. Отметим, что при добавлении к ДМФХ – липосомам раствора мелафена во всем диапазоне концентраций во всех зарегистрированных термограммах выявлялся единственный пик основного термоиндуцированного перехода. Таким образом, можно считать, что мелафен проник ко всем бислоям в мультислоистой липосоме и поверхностно промодифицировал бислой. Эти данные представлены на результирующем графике зависимости энтальпии основного термоиндуцированного перехода ДМФХ от концентрации добавленного раствора мелафена и скоростей прогрева экспериментальных ячеек ДАСМ-4 (рис. 3). Помимо энтальпии таким же изменениям подверглась кооперативность основного фазового перехода. Произошли сдвиги максимума температуры основного фазового перехода. На графиках зависимостей термодинамических параметров плавления ДМФХ от концентрации мелафена при всех исследованных скоростях плавления наблюдались экстремумы в области концентраций мелафена  $10^{-14}$  –  $10^{-8}$  М. В настоящей работе исследования проводились на моделях, имитирующих мембраны животного происхождения, как раз эти концентрации являются действующими для стимуляции развития и роста растительных организмов [24].

Так же для исследования влияния на структуру фосфолипидных микродоменов в мультиламеллярных липосомах применили другое экзогенное синтетическое вещество – феноксан. Это



**Рис. 3.** Влияние мелафена на структуру фосфолипидных микродоменов в мультиламеллярных липосомах. Энтальпия индуцированного основного перехода ДМФХ при разных скоростях прогрева ячеек с образцами. При модификации ДСК метода скорости прогрева 0,125 град/мин; 0,25 град/мин; 0,5 град/мин; 1 град/мин.

гидрофильное производное антиоксиданта фенозана – калиевая соль фенозан-кислоты. В работах Кривандина А.В. и соавторов [23] методом МУРР было показано, что большие (процентные) концентрации фенозана и феноксана разрушают регулярную структуру липидной мембраны: изменяется ширина бислоя и нарушается порядок упаковки бислоев в мультиламеллярных липосомах, сформированных из природных липидов.

В настоящей работе методом ДСК протестировали воздействие водных растворов в широком диапазоне концентраций феноксана на структуру мембраны, сформированной из ДМФХ. Это другой организационный уровень – влияние на микродомены в бислоях. Как и в случае с мелафеном, также выявляется только единственный эндотермический пик основного фазового перехода, что указывает на то, что на все бислои, входящие в состав многослойной мультиламеллярной липосомы, действует феноксан. Было обнаружено, что высокие концентрации феноксана, в отличие от мелафена, деструктурируют бислой, нарушая его микродоменную структуру. На это указывает исчезновение пика основного эндотермического фазового перехода. При добавлении водного раствора феноксана в концентрации  $10^{-4}$  М пик основного эндотермического перехода ДМФХ значительно уменьшается. При более высокой концентрации мелафена пик не выявляется, и энтальпия не высчитывается, что отражено в таблице 1.

Соответственно можно говорить о том, что если фенозан-кислота значительно разрушает структуру фосфолипидных мембран, то ее гидрофиль-

**Влияние феноксана на термоиндуцированные параметры мембран в фосфолипидных мультиламеллярных липосомах, сформированных из ДМФХ. Все измерения проведены в фосфатном буфере при скорости прогрева 1 град/мин.**

Концентрация феноксана (М)	Энтальпия ДМФХ (отн. ед.)	Температура максимума перехода ДМФХ (оС)	Кооперативность (отн.ед.) $n \frac{1}{2}$ ДМФХ
В 10-3	0	0	0
10-4	67,4	24,3	0,7
10-5	417,9	24,3	0,8
10-6	420,9	24,3	1
10-7	184,3	24,3	0,8
10-8	273,2	24,3	0,8
10-9	465,8	24,3	1
10-10	431,2	24,3	1
10-11	411,2	24,3	0,7
10-12	410,8	24,3	0,7
10-13	434,4	24,3	0,8
10-14	436,6	24,3	0,8

ное производное феноксан деструктивно влияет только в больших концентрациях – более  $10^{-4}$  М.

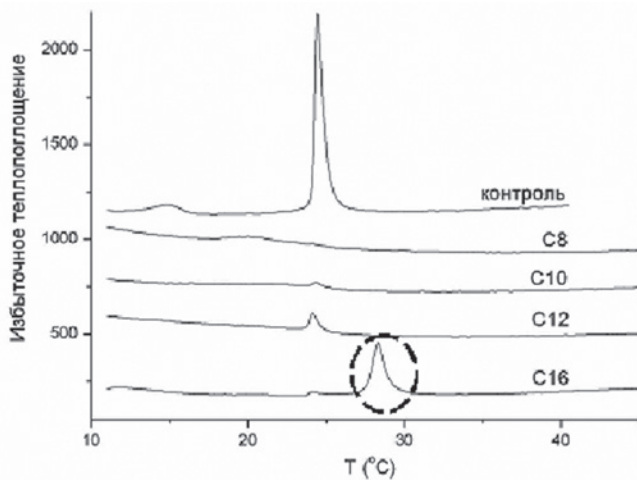
Разрушение микродоменной структуры мембраны, сформированной из ДМФХ, происходит и при тестировании воздействий других производных феноксана – гибридных антиоксидантов ИХФАНов. Это сложные молекулы, имеющие полярную часть с зарядом на атоме азота и гидрофобные алкильные остатки, разной длины. Соответственно, заряженная часть молекул располагается в гидратной оболочке, находящейся вокруг липосом, а гидрофобные остатки внедряются в бислои и располагаются среди жирнокислотных хвостов фосфолипидов. В настоящей работе применяли эмульсию ИХФАНов в среде этанол – вода. Использовали также поэтапное разведение для получения меньших концентраций. Полученные данные представлены на рисунке 4. При концентрации феноксана  $10^{-3}$  М и ИХФАНов в концентрации  $10^{-5}$  М термоиндуцированный переход ДМФХ не выявляется, по-видимому, периодическая структура мембраны липосом значительно нарушается, что согласуется с литературными данными, полученными для больших концентраций феноксана и феноксана [23]. Видно, что ИХФАНы в концентрации  $10^{-5}$  –  $10^{-6}$  М значительно деструктурируют ДМФХ – бислои, пик основного фазового перехода практически исчезает по сравнению с контролем. ИХФАН с самым длин-

ным алкильным остатком формирует собственный пик перехода в бислое. Можно сделать вывод, что гибридные антиоксиданты группы ИХФАНов могут применяться только в малых концентрациях.

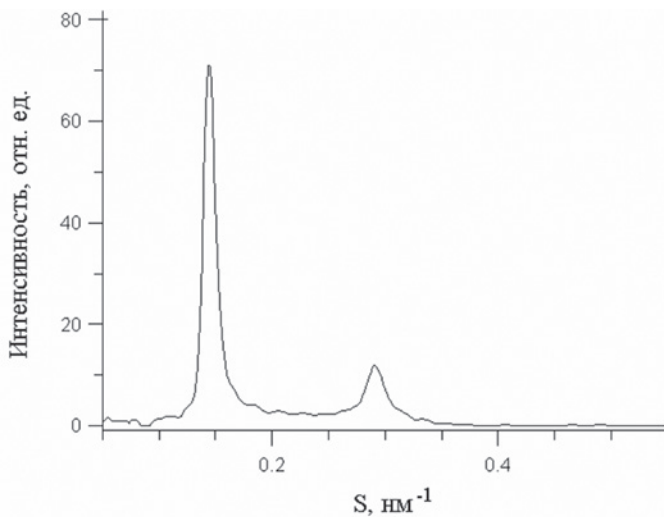
Это согласуется и с данными Кривандина А.В. с соавторами [25], полученными по методу МУРР, из которых следует, что ИХФАН-10 значительно меняет толщины бислоев и порядок их упаковки в мультиламеллярных липосомах, сформированных из природных фосфолипидов.

*Исследование воздействия БАВ – меланфина, на мембраны с использованием второй модели – мультиламеллярных липосом, сформированных из яичного лецитина.* Это более сложный экспериментальный объект и в большей степени приближенный к строению и составу к природным био мембранам. Благодаря стереоспецифическим особенностям природных фосфолипидов бислои в таких мультиламеллярных липосомах имеют мозаичную устойчивую упаковку. Выстраивание бислоя происходит соответственно зарядам молекул, размерам их гидрофильных головок, насыщенности и длине жирнокислотных остатков, а также форме молекул (цилиндрическая, трапецевидная). Поэтому такие бислои оказываются более устойчивыми к воздействию БАВ.





**Рис. 4.** Термограммы плавления ДМФХ мультисамеллярных липосом в присутствии гидрофобных БАВ - ИХФАНов с разной длиной гидрофобной части молекул от С8 до С12. ИХФАН-16 формирует собственную фазу доменов в бислое при концентрациях  $10^{-5}$  -  $10^{-6}$  М (отмечено овалом). Большие концентрации С10 и С12 максимально меняют бислое, С8 и С16 влияют меньше. Оптимальная длина проникающих в бислое алкильных остатков С10, С12. Все измерения проведены в фосфатном буфере при скорости прогрева 1 град/мин.



**Рис. 5.** Малоугловая дифрактограмма дисперсии липосом, сформированных из яичного лецитина, после введения коллимационной поправки.

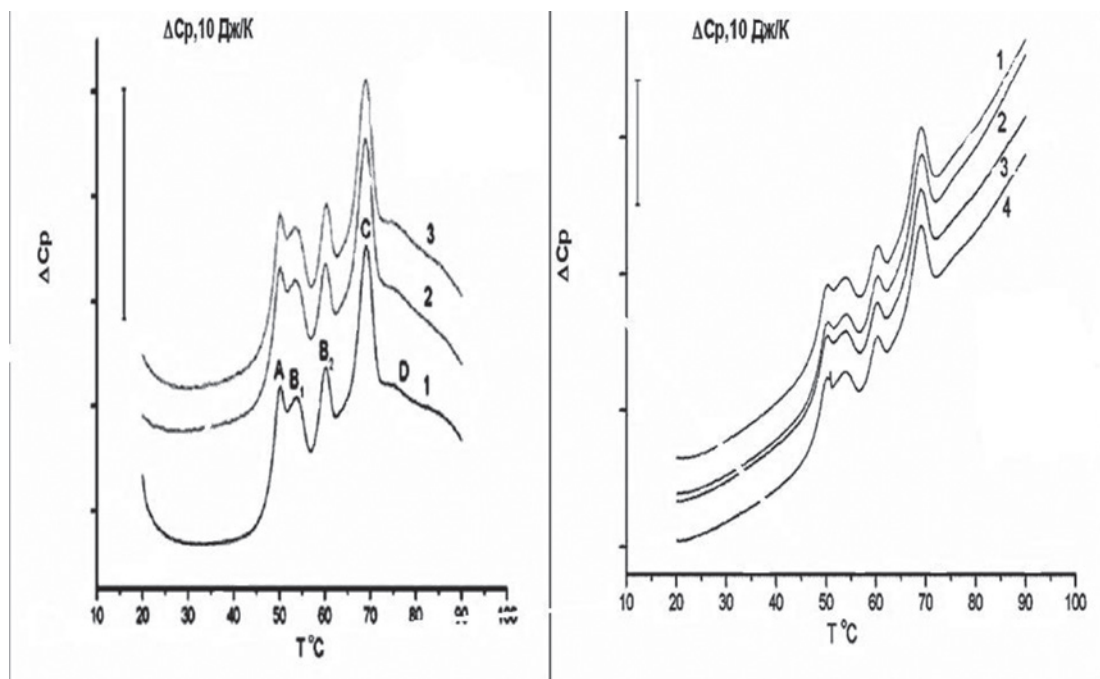
В настоящей работе с применением метода МУРР было выяснено, что на структурные характеристики: толщины бислоев и упорядоченность их упаковки мультисамеллярных липосомах, мелафен в широком концентрационном диапазоне ( $10^{-18}$ ,  $10^{-12}$ ,  $10^{-6}$  М) не влияет. Дифрактограмма исследованных дисперсий липосом приведена на рисунке 5. На дифрактограммах всех исследованных суспензий липосом наблюдаются два дифракционных пика с максимумами при  $S \approx 0.14 \text{ нм}^{-1}$  и  $S \approx 0.29 \text{ нм}^{-1}$ , которые являются первым и вторым

порядками отражения от упорядоченных мультислоев липидных мембран в мультисамеллярных липосомах.

Дифрактограммы всех исследованных дисперсий липосом с добавлением растворов мелафена в широком диапазоне концентраций – от ультра малых до больших, абсолютно одинаковы. Дифрактограммы всех исследованных дисперсий липосом с БАВ и контрольных совпадают. Следовательно, структура мембран в этих липосомах одинаковая. Период повторяемости мембран в липосомах  $D$  составляла 6.9 нм. При расчете по формуле (1) профиля электронной плотности липидных мембран в липосоме толщина одной мембраны, определенная как расстояние между пиками электронной плотности, соответствующими положению полярных групп липидов, составляет около 4 нм. Результаты проведенного рентгеновского дифракционного анализа показывают, что мелафен в широком диапазоне концентраций не изменяет организацию бислоев в фосфолипидных мультисамеллярных липосомах.

Как уже ранее указывалось, исследования методом МУРР влияния производных фенозана на организацию фосфолипидных мультисамеллярных липосом были проведены в работах Кривандина А.В. и соавторов [23, 25]. Фенозан, феноксан и ИХФАН-10, примененные в больших концентрациях, при встраивании в липосомы значительно изменяли структуру бислоев и упаковку в мультисамеллярных липосомах.

Исследование воздействия БАВ – мелафена и производных фенозана, на мембраны с использованием третьей модели – теней эритроцитов. Методом ДСК тестировали влияние БАВ на структуру теней эритроцитов. Тени эритроцитов это белок-липидная модель строения плазматической мембраны и цитоскелета большинства клеток животного организма. Известно, что белки плазматической мембраны и цитоскелета эритроцитов тесно взаимодействуют друг с другом и образуют мембранные домены, денатурация которых формирует структурные тепловые переходы [13,14]. Это 5 идентифицированных структурных денатурационных переходов (А-, В1-, В2-, С- и D- переходы). А-пик соответствует денатурации белков цитоскелета – спектрина и актина, которые обеспечивают способность эритроцитов к деформации, что является важнейшей характеристикой. В1-пик соответствует денатурации белков цитоскелета – анкирина и демантина и белков электрофоретических полос 4,1 и 4,2, которые являются мембранными фрагментами ионных каналов. В2-пик соответствует денатурации белков электрофоретической полосы 3, которые являются цитоплазматическими фрагментами ионных каналов. С-пик соответствует денатурации 55 кДа белка в электрофоретической полосе 3, этот



**Рис. 6.** Влияние мелафена на структуру белковых микродоменов при старении мембран теней эритроцитов. Слева термограммы денатурационных переходов в первый день после получения теней, справа во второй день. Все измерения проведены в фосфатном буфере при скорости прогрева 1 град/мин. Обозначения: 1-й день – 1- контроль; 2-  $10^{-5}$  М мелафен; 3-  $10^{-3}$  М мелафен. 2-й день – 1- контроль; 2-  $10^{-8}$  М мелафен; 3-  $10^{-6}$  М мелафен; 4-  $10^{-4}$  М мелафен. A, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, C, D – пики термоденатурационных переходов белковых микродоменов теней эритроцитов.

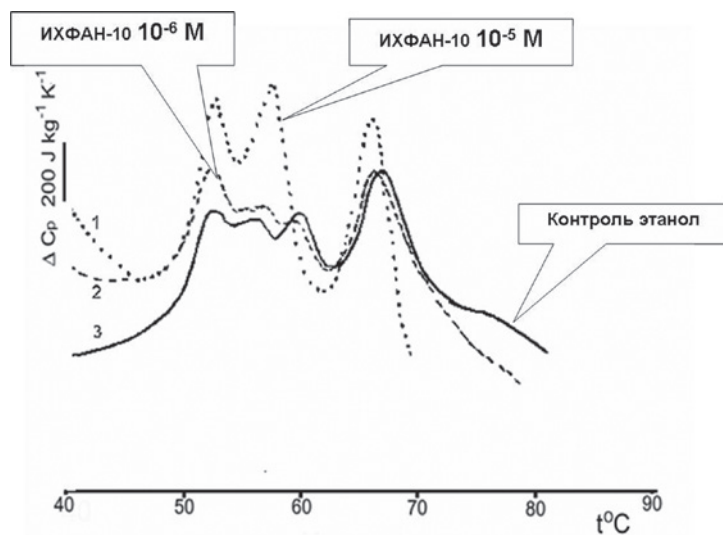
белок является мембранным фрагментом ионных каналов. D–пик соответствует денатурации не идентифицированных белков, приводящей к разрушению мембраны.

Для исследования воздействия мелафена на тени эритроцитов, учитывая устойчивость предыдущих моделей к воздействию этого БАВ в широком диапазоне концентраций, тени подвергли состариванию. Известно, что при хранении белок-липидных везикул происходит разрушение структуры, она становится менее упорядоченной и более уязвимой для воздействий. Тени эритроцитов подвергались термоиндуцированной денатурации сразу после их получения и на второй день, т.е. состаренные. Кривые термоиндуцированной денатурации – термограммы теней в присутствии разных концентраций мелафена ( $10^{-8}$  М –  $10^{-3}$  М) представлены на рисунке 6.

Данные, полученные при денатурации теней эритроцитов, указывают на устойчивость всех белковых компонентов плазматической мембраны и цитоскелета эритроцитов к воздействию больших и малых концентраций мелафена. Если гидрофильный мелафен не влиял на структуру белковых микродоменов теней, то производные фенозана вызывали перегруппировку белковых микродоменов. Доза-зависимо менялась их устойчивость к термоденатурации. На рисунке 7 представлены термограммы теней эритроцитов в первый день после получения. Видно, что кон-

трольная термограмма проявляет все 5 термоденатурационных пика. Добавление во время процедуры получения теней из эритроцитов ИХФАН-10 в концентрации  $10^{-5}$  М вызывает слияние пиков B<sub>1</sub> и B<sub>2</sub>, изменение температур максимумов переходов по сравнению с контролем. Но в присутствии ИХФАН-10 в концентрации  $10^{-6}$  М вид термограммы возвращается к контрольному. По-видимому, происходит встраивание ИХФАН-10, нарушающее распределение белковых микродоменов при больших концентрациях БАВ, и стабилизирующее – при меньших концентрациях.

Обнаружено, что ИХФАН-10, в меньших по сравнению с феноксаном (данные не указаны на рисунках) концентрациях, деструктурирует мембранные белки. Однако белковые домены оказываются более устойчивыми к действию производных фенозана, чем чисто липидные. ИХФАН-10 и феноксан смещают A-переход в область более высоких температур, B<sub>2</sub>, C и D-переходы смещаются в область более низких температур. На термограммах видно, что цитоскелетные белки теней эритроцитов: 5 структурных переходов на термограммах, не меняют своей формы при действии феноксана в концентрации  $10^{-5}$  М и ИХФАН-10 в концентрации  $10^{-6}$  М. Феноксан в концентрации  $10^{-5}$  М также не менял форму термограмм. Но ИХФАН в концентрации  $10^{-5}$  М вызывает слияние B<sub>1</sub> и B<sub>2</sub> переходов) и происходит смещение температуры максимумов переходов.



**Рис. 7.** Влияние ИХФАН-10 на структуру белковых микродоменов мембран теней эритроцитов. Обозначения термограмм денатурационных переходов: 1 - с добавлением  $10^{-5}$  М ИХФАН-10; 2 - с добавлением  $10^{-6}$  М ИХФАН-10; 3 - контрольный образец с добавлением фосфатного буфера с этанолом. Все измерения проведены в фосфатном буфере при скорости прогрева 1 град/мин.

Сдвиги максимальных значений термоиндуцированных переходов свидетельствуют о перестройках в организации белковых доменов в присутствии феноксана и ИХФАН-10 в концентрации  $10^{-5}$  М. При воздействии феноксана и ИХФАН-10 в концентрации  $10^{-6}$  М домены сохраняются, но меняются их термодинамические параметры.

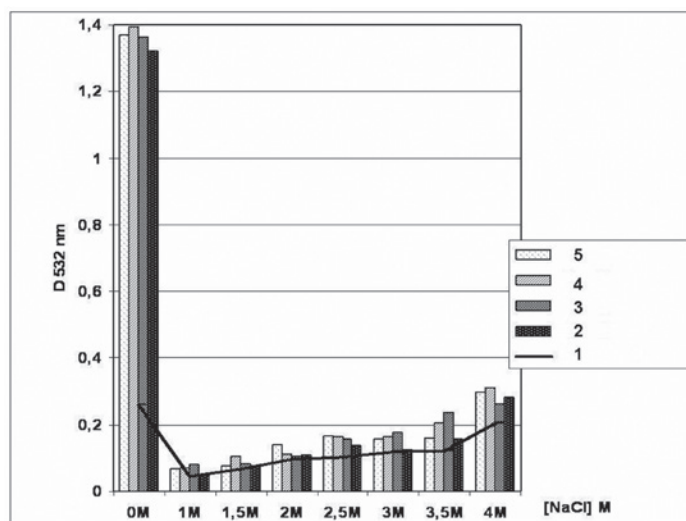
Полученные данные коррелируют с исследованиями, проведенными для фенозана, феноксана и ИХФАН-10 Кривандиным А.В. с соавторами [23, 25], в которых методом МУРР были показаны значительные деформирующие воздействия на организацию мембран в мультиламеллярных липосомах. Фаткуллина Л.Д. с соавторами [26] показала, что малые концентрации ИХФАН-10 стабилизируют бислои, встраиваясь между жирнокислотными остатками фосфолипидной фазы, а также тормозят процессы перекисного окисления.

*Исследование воздействия БАВ – мелафена, на мембраны с использованием четвертой модели – изолированных из кровяного русла эритроцитов.* Помимо тестирования воздействия на мембраны липидные, белок-липидные необходимо было также провести и наблюдение за поведением целых клеток в присутствии изучаемого БАВ. Ранее уже было показано влияние фенозана и его производных на морфологию и структурные свойства клеток – эритроцитов [15, 26]. В настоящей работе с учетом того, что наряду с воздействием экзогенного вещества может меняться и окружающая среда, рассмотрели сочетание воздействия мелафена и физико-химического изменения экспериментальной среды. При изменении ионной силы среды, в которую помещались эритроциты и добавлялись растворы мела-

фена в широком диапазоне концентраций, была проведена спектрофотометрическая регистрация освобождения гемоглобина из эритроцитов. Известно, что изменение ионной силы посредством добавления растворов NaCl значительно меняет проницаемость [27] эритроцитов. На рисунке 8 приведен график изменения проницаемости мембран эритроцитов в зависимости от концентрации мелафена и NaCl.

Было обнаружено, что мелафен в концентрациях  $10^{-3}$  М,  $10^{-5}$  М,  $10^{-7}$  М,  $10^{-9}$  М значительно увеличивает проницаемость эритроцитов для гемоглобина, что вызывает добавочное повреждение мембран по сравнению с контролем в присутствии разных значений ионной силы экспериментальной среды. Таким образом, было показано, что в целых клетках – эритроцитах мелафен вызывает дополнительную проницаемость мембран в условиях осмотического стресса. Поэтому не может применяться, как протектор для защиты целостности клеточной мембраны.

В итоге проведенных исследований выяснили, что в зависимости от степени усложнения экспериментального объекта менялся и вид воздействия мелафена и производных фенозана. Биологически активные вещества изменяли структуру синтетических мультиламеллярных липосом. Липосомы из смеси природных фосфолипидов проявили большую устойчивость структуры к воздействию биологически активных веществ. Далее исследования воздействия веществ проводились на экспериментальных моделях с более высокими уровнями организации структуры: тени эритроцитов, и целые клетки – эритроциты, Эффекты веществ на строение более сложные объектов но-



**Рис. 8.** Влияние мелафена на гипо- и гиперосмотический гемолиз эритроцитов. Обозначения: 1 - контроль; 2 -  $10^{-3}$  М мелафен; 3 -  $10^{-5}$  М мелафен; 4 -  $10^{-7}$  М мелафен; 5 -  $10^{-9}$  М мелафен.

силы не просто структурное воздействие, но влияли и на функционирование органелл и клеток.

**Закключение.** Было показано, что экзогенные синтетические вещества: мелафен и производные фенозана при применении в определенных концентрациях не разрушают чисто липидные мембраны и белок – липидный цитоскелет тений эритроцитов. В этом случае они могут использоваться, как регуляторы активностей природных объектов при воздействии на уровне липидных и белковых компонентов клеток. Экспериментальные объекты могут представлять интерес и как переносчики веществ. Фосфолипидные мультиламеллярные липосомы насыщаются, как гидрофобными, так и гидрофильными веществами. Температура переходов из жидко-кристаллического состояния в гели-

евое может регулироваться веществами, что важно для формирования гидрофильных нанопор и понимания структуры биомембран при охлаждении и нагревании. Изменения структуры цитоскелета под действием веществ также будет оказывать влияние на функционирование клетки. Проницаемость мембран органелл и клеток, обеспечивающая активацию мембранных компонентов, может быть регулируемой не только эндогенными, но и экзогенными (синтетическими и природными) веществами. Полученные результаты с применением биологически активных веществ позволяют увидеть дальнейшие перспективы в регуляции структуры клеточных объектов и их компонентов, без разрушения, что приведет к возможности регуляции функций.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Фатахов С-Г.Г., Резник В.С., Коновалов А.И. Меламиновая соль бис гидроксиметил фосфиновой кислоты (Мелафен), как новый сильный регулятор роста растений. В кн. Материалы 13 интернациональной конференции химии фосфорных соединений. С-Пб. 20S. 80.
2. Ершов В.В., Никифоров Г.А., Володькин А.А. Пространственно- затруднённые фенолы. М. Химия. 1972.
3. Никифоров, Г.А. Белостоцкая И.С., Вольева В.Б., Комиссарова Н.Л., Горбунов Д.Б. Биоантиоксиданты «оплавленного» типа на основе производных 2,6 дитретбутил-фенола. В сб.: Биоантиоксидант. Научный вестник мед.акад.2003; 50-51.
4. Тараховский Ю.С., Кузнецова С.М., Васильева Н.А., Егорочкин М.А., Ким Ю.А. Взаимодействие таксифолина (дигидро-кверцетина) с мультиламеллярными липосомами из димиристилфосфатидилхолина. Биофизика. 2008; 53:78-
5. Антонов В.Ф., Смирнова Е.Ю., Шевченко Е.В. Липидные мембраны при фазовых превращениях. М. Наука. 19
6. Тараховский Ю.С. Интеллектуальные липидные наноконтейнеры в адресной доставке лекарственных веществ. М.: Издательство ЛКИ. 2011.
7. Харакоз Д.П. О возможной физиологической роли фазового перехода «жидкое-твердое» в биологических мембранах. Успехи Биологических Наук. 20264-3
8. Филиппов А.В., Рудакова М.А., Гиматдинов Р.С., Семина И.Г. Диффузия липидов в биологических мембранах. Учебное пособие для студентов третьего и четвертого курсов специализации. Медицинская физика физического факультета. Казань 20
9. Lindblom G., Oradd G., Filippov A. Lipid lateral diffusion in bilayers with phosphatidylcholine, sphingomyelin and cholesterol. An NMR study of dynamics and lateral phase separation. Chem Phys Lipids. 2006; 141: 179-184.
10. Свиргун Д.И., Фейгин Л.А. Рентгеновское и нейтронное малоугловое рассеяние. М. Изд. Наука. 19
11. Dodge J.T., Mitchell C., Hanahan D.J. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghost of human erythrocytes. Arch. Biochem. Biophys. 1963; 100: 199-130.
12. Sato Y., Yamakose H. Suzuki Ya. Mechanism of hypotonic hemolysis of human erythrocytes. Biol. Pharm. Bull. 1993; 16: 506-512.
13. Акоев В.Р., Щербинина, С.П. Матвеев А.В., Тараховский Ю.С., Деев А.А., Шныров В.Л. Исследование структурных переходов в мембранах эритроцитов при наследственном гемохроматозе. Бюллетень Экспериментальной Биологии и Медицины. 1997; 123: 279-2
14. Акоев В.Р., Матвеев А.В., Беляева Т.В., Ким Ю.А. The effect of oxidative stress on structural transitions of human erythrocyte ghost membranes. Biochim Biophys Acta. 1998; 1371: 284-2
15. Гендель Л.Я., Ким Л.В., Лунёва О.Г., Федин В.А., Крулякова К.Е. Изменения поверхностной архитектоники эритроцитов под влиянием синтетического антиоксиданта фенозана-Известия РАН. Серия Биология. 1996; 4: 508-5
16. Бурлакова Е.Б., Голощанов А.Н., Трещенкова Ю.А. Действие малых доз фенозана на биохимические свойства лактатдегидрогеназы и микровязкость мембран микросом мозга мышей. Радиационная биология. Радиоэкология. 2003; 3: 320-3
17. Ким Ю.А., Елемесов Р.Е., Акоев В.Р. Гиперосмотический гемолиз эритроцитов и антигемолитическая активность фракции сапонинов и тритерпеновых гликозидов из Panax Ginseng C.A.Meyer. Биологические мембраны. 2000; 17: 15-
18. Прокопов А.А., Шукиль Л.В., Берлянд А.С. Изучение метаболизма фенозан-кислоты в организме кроликов. Химико-фармацевтический журнал. 2006; 40: 3-
19. Бурлакова Е.Б. Эффект сверхмалых доз. Вестник российской Академии наук. 1994; 64: 425 - 431.
20. McMullen T.P.W., Lewis R.N.A.H., Mc Elhaney R.N. Differential scanning calorimetry study of the effect of cholesterol on the thermotropic phase behavior of a homologous series of linear saturated phosphatidylcholines. Biochemistry. 1993; 32: 516-552.
21. Jager F.C. Determination of vitamin E

requirement in rats by means of spontaneous haemolysis in vitro. *Nutr. et Diets.* 1968; 10: 215-223.

22. Privalov P.L., Plotnikov V.V. Three generations of scanning microcalorimeters for liquids. *Therm. Acta.* 1989; 139: 257-277.

23. Архипова Г.В., Бурлакова Е.Б., Кривандин А.В., Погорельская И.Л. Влияние фенозана на структуру фосфолипидных

мембран. *Нейрохимия.* 1996; 13:128-1

24. Фаттахов С.Г. Мелафен – перспективный препарат для сельского хозяйства, биотехнологий и экобиотехнологии. В кн.: Мелафен: механизм действия и области применения. ред. Фаттахова С.Г., Кузнецова В.В., Загоскиной Н.В. Казань: Печать – Сервис XXI век; 2014: 9-25. Кривандин А.В. Фаткуллина Л.Д.

Исследование встраивания антиоксиданта ИХФАН в липосомы методом малоуглового рентгеновского рассеяния. *Химическая физика.* 2013; 32: 91-

26. Fatkullina L.D., Vekshina O.M. (Aleksееva O.M.), Burlakova E.B., Goloshchapov A.N., Kim Yu.A. Stabilization of cell membranes by hybrid antioxidants in therapy of neurodegenerative diseases. In book "In Biotechnology: State of

the Art and Prospects for Development" Ed. by P.E. Stott and G.E. Zaikov. New York. Nova Science Publishers; 2008: Chapter 115-123. 27. Kim Ю.А., Елемесов Р.Е., Акоев В.Р. Гиперосмотический гемолиз эритроцитов и антигемолитическая активность фракции сапонинов и тритерпеновых гликозидов из *Panax Ginseng* С.А. Meyer. *Биологические мембраны.* 2000; 17: 15-

## REFERENCES:

- Fattakhov S.G., Reznik V.S., Konovalov A.I. Melamine Salt of Bis (hydroxymethyl) Phosphinic Acid (Melaphene) as a New Generation Regulator of Plant Growth Regulator. Proceedings of the 13th International Conference on Chemistry of Phosphorus Compounds. St. Petersburg. 202 (in Russian).
- Ershov V.V., Nikiforov G.A., Volodkin A.A. Spatially hampered phenols. *M. Khimia.* 19(in Russian).
- Nikiforov G.A., Belostotskaya I.S., Vol'eva V.B., Komissarova N.L., Gorbunov D.B. Bioantioxidants "float types" at base of derivatives 2,6 ditret butyl fenyl. Scientific Bulletin of the Tyumen Academy of Medicine: «Bioantioxidants». 2003; 1: 50-51 (in Russian).
- Tarachovsky Yu.S., Kusnetsova S.M., Vasilieva N.A., Egorochkin M.A., Kim Yu.A. Relationships of taxifolin (dihydroquercitine) with multilamellar liposomes from dimyristoilphosphatidylcholine. *Biophysics.* 2008; 5: 279-84 (in Russian).
- Antonov V.F., Smirnova E.Yu., Shevchenko E.V. Lipid membranes under the phase transitions M. *Nauka.* 19(in Russian).
- Tarachovsky Yu.S. Intellectual lipid's nana containers at address transport of medical substances. *M. LKI.* 20(in Russian).
- Charakoz D.P. About the possible physiological role of phase transition "liquid-solid" at biological membranes. 2001; 41: 54 - 7 (in Russian).
- Filippov A.V., Rudakova M.A., Gimatdinov

R.S., Semina I.G. Lipids diffusion at biological membranes. Educational material for students of third and fourth courses specialization. Medical Physics of physics department. Kazan. 20(in Russian).

- Lindblom G., Oradd G., Filippov A. Lipid lateral diffusion in bilayers with phosphatidylcholine, sphingomyelin and cholesterol. An NMR study of dynamics and lateral phase separation. *Chem Phys Lipids.* 2006; 141: 179-184.
- Svergun D.I., Feigin L.A. Rentgen and neutron small angle scattering. *M. Nauka.* 19(in Russian).
- Dodge J.T., Mitchell C., Hanahan D.J. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghost of human erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 1963; 100: 199-130.
- Sato Y., Yamakose H., Suzuki Ya. Mechanism of hypotonic hemolysis of human erythrocytes. *Biol. Pharm. Bull.* 1993; 16: 506-512.
- Akoev V.R., Sherbinina S.P., Matveev A.V., Tarachovsky Yu.S., Deev A.A., Shnirov V.L. Investigations of structural transitions at erythrocytes' membrane when hereditary hemochromatosis. *Bulletin Experimental biology and medicine.* 1997; 123: 279-84 (in Russian).
- Akoev V.R., Matveev A.V., Belyaeva T.V., Kim Ya. The effect of oxidative stress on structural transitions of human erythrocyte ghost membranes. *Biochim Biophys Acta.* 1998; 1371: 284-294.

- Gendel L.J., Kim L.V., Luneva O.G., Fedin V.A., Kruglakova K.E. Changes of cursory architectonics of erythrocytes under the impact of synthetic antioxidant Fenosan-Reports of Russian Academy of Science. Series. Biol. 1996; 4: 508-512 (in Russian).
- Burlakova E.B., Goloshchapov A.N., Treschenkova U.A. The low doses actions to the biochemical properties of lactatdehydrogenase and microviscosity brain microsomes membranes of mice. *Radiation biology. Radioecology.* 2003; 3: 320-323 (in Russian).
- Kim Yu.A., Elemesov R.E., Akoev V.R. Hyper osmotic hemolysis of erythrocytes and antihemolytic activity of saponins faction and triterpens glycosides from *Panax Ginseng* C. A. Meyer. *Biological Membrane.* 2000; 17: 15-26 (in Russian).
- Prokopov A.A., Berland A.C., Shukil L.V. Investigation of Phenosan-acid acid metabolism at rabbit body. *Pharmaceutical Chemistry Journal.* 2006; 2: 3-4 (in Russian).
- Burlakova E.B. Effect of super low doses. *Herald of Russian Academy of science.* 1994; 64: 425 - 431(in Russian).
- McMullen T.P.W., Lewis R.N.A.H., Mc Elhanev R.N. Differential scanning calorimetry study of the effect of cholesterol on the thermotropic phase behavior of a homologous series of linear saturated phosphatidylcholines. *Biochemistry.* 1993; 32: 516-552.
- Jager F.C. Determination of vitamin E requirement in rats by means of spontaneous haemolysis in vitro. *Nutr. et Diets.* 1968; 10:

- 215-223.
- Privalov P.L., Plotnikov V.V. Three generations of scanning microcalorimeters for liquids. *Therm. Acta.* 1989; 139: 257-277.
- Archipova G.V., Burlakova E.B., Krivandin A.V., Pogoretskaya I.L. Phenosan-acid influence to phospholipid membrane. *Neurochemistry.* 1996; 13: 128-132 (in Russian).
- Fattakhov S.G. Melaфen- perspective preparation for agricultural, biotechnology and ecobiotechnology. At Book: Melaфen: mechanism of action and regions of using. Eds: Fattachov S.G., Kuznetsov V.V., Zagoskina N.V., Kazan: Print-Servis-XXI century; 2014: 9-14 (in Russian).
- Krivandin A.V., Fatkullina L.D. Investigation of antioxidant IHFAN incorporation to liposomes by method small angle Rentgen scattering. *Chemical Physics.* 2013; 32: 91-(in Russian).
- Fatkullina L.D., Vekshina O.M. (Aleksееva O.M.), Burlakova E.B., Goloshchapov A.N., Kim Yu.A. Stabilization of cell membranes by hybrid antioxidants in therapy of neurodegenerative diseases. In book "In Biotechnology: State of the Art and Prospects for Development" Ed. by P.E. Stott and G.E. Zaikov. New York. Nova Science Publishers; 2008: Chapter 115-123.
- Kim Yu. A. Elemesov R. E. Akoev V. R. Hyper osmotic hemolysis of erythrocytes and antihemolytic activity of saponins faction and triterpens glycosides from *Panax Ginseng* C. A. Meyer. *Biological Membrane.* 2000; 17: 15-26 (in Russian).

O.M. Alekseeva<sup>1</sup>, A.V. Kremensova<sup>1</sup>, A.V. Krivandin<sup>1</sup>, O.V. Shatalova<sup>1</sup>, Yu.A. Kim<sup>2</sup>

## MODEL BIOMEMBRANES AS TEST OBJECTS FOR THE DETERMINATION OF CONCENTRATION RANGES OF HARMFUL CHEMICAL SUBSTANCES IN BIOLOGICAL MEDIUMS AND OBJECTS OF EXTERNAL ENVIRONMENT

<sup>1</sup>N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, 119334, Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup>Institute of Cell Biophysics, Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences, 142290, Pushchino, Russian Federation

The paper presents data on changes in model biomembranes (liposomes, erythrocyte shadows, erythrocytes) used as test objects to determine those ranges of concentrations of biologically active substances in which there is no violation of the structure or function of experimental objects. Melaphene, plant growth regulator used in small doses in seed pre-treatment, and antioxidant phenosan derivatives, phenoxane and IHFANs, have been used as biologically active substances. It was shown by DSC that phenosan derivatives at concentrations equal to  $10^{-5}$  M and higher destroy the microdomain organization in the bilayers of phospholipid multilamellar liposomes and reshape protein microdomains in the shadows of red blood cells. Melaphene in small and large concentrations changes polymodal the microdomain organization in the bilayers of phospholipid multilamellar liposomes without destroying the structure and does not affect the protein microdomains in the shadows. An increase in the membrane permeability in isolated intact erythrocytes in the presence of melaphene in large and small concentrations has been revealed by means of spectral analysis. The method of small-angle diffraction scattering showed the absence of the effect of melaphene in a wide range of concentrations on the thickness of phospholipid bilayers and the order of their packaging in multilamellar liposomes.

**Keywords:** phospholipids, multilamellar liposomes, biologically active substances, erythrocyte shadows, erythrocytes, DSC, small-angle diffraction scattering.

Материал поступил в редакцию 23.04.2019 г.

УДК 615.099 : 615.035 : 615.246.9

# ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ АНТИДОТНОЙ ТЕРАПИИ ОТРАВЛЕНИЙ ЦИАНИДАМИ

В.Д. Гладких,  
Г.В. Вершинина

ФГУП НПЦ «Фармзащита»  
Федерального медико-биологического  
агентства, 141402, г. Химки,  
Российская Федерация

**В** статье, на основании анализа литературы, обсуждаются перспективные направления разработки антидотной профилактики и терапии острых отравлений цианидами. На роль потенциальных антидотов цианидов, эффективных и безопасных при внутримышечной и внутрикостной инъекциях, ингаляционной и пероральной доставке, претендуют химические соединения, опосредующие антицианидную активность за счет стимуляции основных механизмов детоксикации эндогенного цианида: сульфанген, кобинамид,  $\alpha$ -кетоглутаровая кислота.

**Ключевые слова:** антидоты, детоксикация, кобинамид, токсичность, сульфанген, цианиды,  $\alpha$ -кетоглутаровая кислота.

**Введение.** В рамках Международной программы химической безопасности Всемирной организации здравоохранения разработан и рекомендован к применению список цианидных антидотов, включающий: амилнитрит, тиосульфат натрия, нитрит натрия, 4-диметиламинофенол, гидроксокобаламин и дикобальтовую соль этилендиаминтетрауксусной кислоты. Практически все перечисленные антидоты, за исключением гидроксокобаламина, обладают выраженным побочным действием. Ни один из существующих цианидных антидотов не отвечает критериям, предъявляемым к «идеальному» противоядию, который, по мнению А. Н. Hall et al. [1], должен отвечать следующим требованиям: быстрое начало действия; нейтрализация цианида без нарушения транспортных функций кислорода; наличие защитных и переносимых профилей для использования на догоспитальном этапе; безопасность применения пораженным токсическими продуктами горения; безопасность назначения пациентам с не подтвердившимся диагнозом отравления цианидами; простота введения. Отсутствие международной гармонии в отношении эффективности и безопасности существующих цианидных антидотов [2] инициирует серьезные исследовательские усилия по разработке инновационных антидотов.

В результате экспериментально-теоретических исследований, выполненных в последние го-

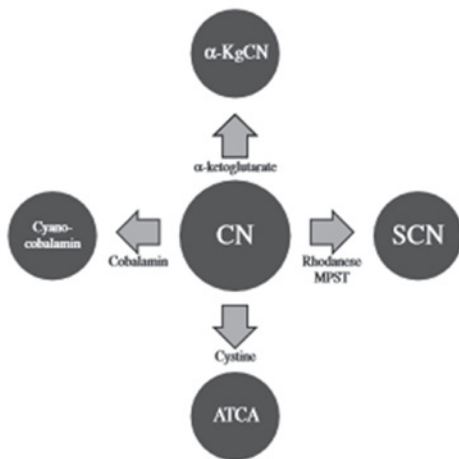
ды, на роль потенциальных антидотов цианидов, эффективных и безопасных при внутримышечной и внутрикостной инъекциях, ингаляционной и пероральной доставке, претендуют химические соединения, опосредующие антицианидную активность за счет стимуляции основных механизмов детоксикации эндогенного цианида (рис.1).

*Детоксикация цианидов посредством образования нетоксичных роданистых соединений.* При острой цианидной интоксикации одним из направлений антидотной терапии является введение донора серы для ускорения биотрансформации цианида до тиоцианата (SCN). Ферментативная конверсия цианида в тиоцианат (SCN), катализируется роданазой либо 3-меркаптопируватсульфотрансферазой (3-MPST).

Оба фермента образуют тиоцианат в качестве продукта сульфатирования цианидов, используя при этом различные субстраты и механизмы катализа. Введение экзогенных субстратов серы, таких как традиционный антидот цианидов тиосульфат натрия, увеличивает пул субстратов для облегчения опосредованной роданазой реакции. Учитывая побочные токсичные реакции тиосульфата натрия, в качестве потенциальных антидотов цианидов рассматриваются доноры серы, альтернативные тиосульфату натрия.

Определенный прогресс был достигнут при скрининге на антицианидную активность 3-Mercaptopyruvatedithiane (*Sulfangen sodium*).

Гладких Вадим Дмитриевич (Gladkikh Vadim Dmitrievich), доктор медицинских наук, профессор, заместитель директора по науке ФГУП НПЦ «Фармзащита» Федерального медико-биологического агентства, Gladkikh2007@rambler.ru  
Вершинина Галина Васильевна (Vershinina Galina Vasilevna), научный сотрудник научно-организационного отдела ФГУП НПЦ «Фармзащита» Федерального медико-биологического агентства, vershinina@atompfarm.ru



**Рис. 1.** Механизмы детоксикации эндогенного цианида с образованием нетоксичных α-кетоглутарат циангидринов (A-KgCN); цианкобаламина (суанособаламин); 2-амино-2-тиазолин-4-карбоновой кислоты (ATCA) и тиоцианата (SCN)

Сульфанген (*Sulfangen sodium*) спонтанно диссоциирует с катаболитом цистеина 3-меркаптопируватом. Последний является субстратом 3-MPST, который катализирует высвобождение сульфана (синглетной серы) из 3-меркаптопирувата. Взаимодействие циан-иона с сульфано приводит к образованию тиоцианата (рис.2).

Водорастворимые соли сульфангена были получены в ряду эквипотентных сульфангену натрия солей триэтаноламмония, диэтаноламмония, глюкозаммония, N,N-димилэтаноламмония, N-метилэтаноламмония и холина. Сравнительные исследования солей сульфангена, включая растворимость, токсичность и эффективность, проводятся для выбора оптимального кандидата для коммерческого развития данного направления поиска антидотов цианидов.

При профилактическом (за 30 мин до затравки) внутрибрюшинном введении сульфангена индекс защиты (ИЗ) составлял 3,8 – 4,3; при терапевтическом (через 5 мин после воздействия цианидов) введении ИЗ = 4 [3]. Сульфанген оказался эффективным противоядием цианида в экспериментальных моделях (внутривенное введение

в опытах на мышах, кроликах, свиньях) острого отравления цианидами [4, 5].

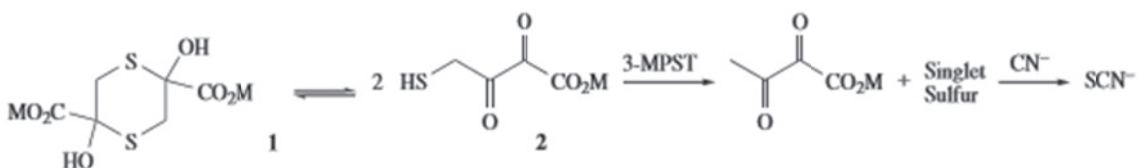
В качестве другого направления поиска безопасных и эффективных антидотов цианидов рассматривалась возможность использования экзогенно вводимой роданазы. Так как роданазы локализуется в матрице митохондрий, неорганические ионизированные доноры серы, такие как тиосульфат натрия, имеют ограниченную доступность к ферменту. Чтобы преодолеть это фармакокинетическое ограничение, кристаллизованную роданазу вводили непосредственно в кровотоки. В более ранних исследованиях было показано, что одновременное введение тиосульфата натрия и очищенной бычьей роданазы значительно уменьшало летальность цианида, однако продолжительность защитного действия была короткой, что ограничивало возможность использования данного подхода [6].

Для увеличения продолжительности действия экзогенно вводимой роданазы J. L. Way [7] инкапсулировал бычью роданазу в эритроциты, а I. Petrikovics, et al. [8] использовали бутантиосульфат в качестве альтернативного донора серы, который вводили после внутривенной инъекции инкапсулированной бычьей роданазы.

Потенциальные ограничения этого подхода для практической реализации использования роданазы в качестве антидота связаны с возможным развитием аллергических реакций, которые могут быть преодолены с помощью рекомбинантной человеческой роданазы. В недавних исследованиях сообщалось об использовании липосомных везикул, инкапсулирующих роданазу в виде цианидного антидота [9]. Об антидотной эффективности этих систем доставки не сообщалось.

В метаболизме цианида участвуют также фермент цистатионаза-γ-лиаза (γ-цистатионаза), продуцирующая тиоцистин (бис(2-амино-2-карбокситил)трисульфид) и тиоцистеин (3-(тиосульфено)аланин).

Тиоцистин оказался в семь раз эффективнее тиосульфата натрия в качестве сернистого субстрата в катализируемом роданазой транссульфировании цианида в SCN<sup>-</sup> [10]. Не исключается возможность использования этого эндогенного



**Рис. 2.** 3-MPST опосредованный метаболизм цианида: сульфанген (соединение 1); 3-меркаптопируват (соединение 2) с последующей реакцией образования тиоцианата.

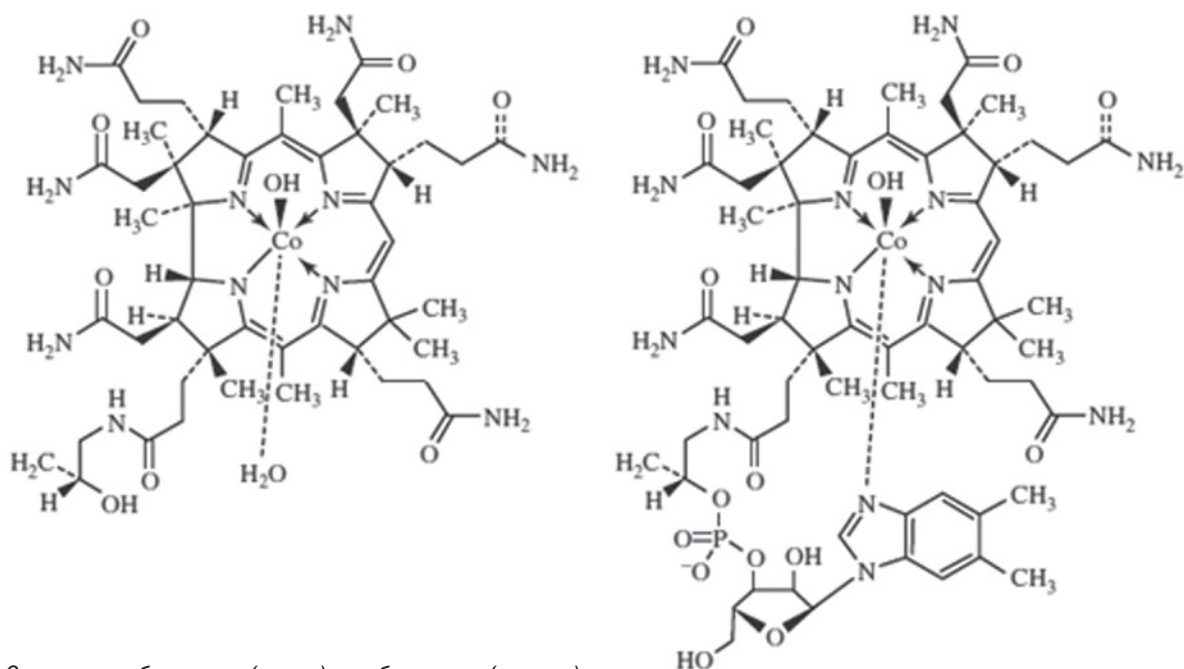


Рис. 3. Структура кобинамида (слева) и кобаламина (справа)

механизма детоксикации при поиске потенциальных антидотов цианидов.

В качестве одного из перспективных направлений рассматривалась разработка антидотов на основе дисульфидов как донаторов серы (вещества под кодом *ICD*). В экспериментах на животных по меньшей мере два донатора серы в выбранных дозах обеспечивали 100%-ю защиту от  $2DL_{50}$  NaCN: препараты *ICD2214* (2-аминоэтил 4-метоксифенил дисульфид гидрохлорид) и *ICD2467* (бис 4 метоксифенил дисульфид). Данные соединения вводили внутривенно за 15 мин до введения цианида натрия [11].

*Детоксикация цианидов посредством образования нетоксичных цианкобаламинов.*

Циан-ион представляет собой амбидентатный лиганд, который связывается с комплексообразователем через разные атомы, входящие в его состав. В биологических системах он легко образует комплексы с переходными тяжелыми металлами (в частности, с кобальтом в белковых комплексах). Образование металлоцианидных комплексов лежит в основе антидотного действия гидрокобаламина и потенциального антидота цианидов - кобинамида [12].

Кобинамид (*Cobinamide*) — предпоследнее соединение в цепи биосинтеза кобаламина (витамина  $B_{12}$ ). Он отличается от кобаламина отсутствием рибонуклеотидной группы диметилбензимидазола, привязанной к пуриновому кольцу и скоординированной с нижним осевым положением атома кобальта (рис. 3). Особенности его химического строения (по сравнению с кобаламином)

позволяют предполагать наличие у него более выраженной антицианидной активности, обусловленные следующими положениями.

Во-первых, оба сайта связывания верхнего и нижнего лигандов кобинамида являются свободными, тогда как кобаламин имеет только сайт связывания с верхним лигандом. Следовательно, кобинамид может связывать два цианидных иона (тогда как кобаламин связывает только один), тем самым создавая равноэффективный защитный эффект при введении в меньших дозах.

Во-вторых, группа диметилбензимидазола имеет отрицательный трансэффект на верхнем связующем сайте кобаламина, вытягивая кобальт из плоскости пуринового кольца, тем самым уменьшая аффинность кобаламина к лигандам. В результате кобаламин связывает цианид с константой ассоциации (*КА*)  $1012M^{-1}$ . В то же время кобинамид связывает первый циан-ион с  $КА > 1014 M^{-1}$ , второй — с  $КА 108 M^{-1}$  (суммарный  $КА > 1022 M^{-2}$ ). Последнее значение представляет собой достаточно высокую константу ассоциации, свойственную хелатирующим агентам [13].

В-третьих, кобинамид является менее водорастворимым, чем кобаламин, что позволяет использовать более концентрированные растворы первого по сравнению с последним. При растворении в воде гидроксил и молекула воды связываются с кобальтом кобинамида, в результате получается гидрокобинамид.

Антицианидная эффективность кобинамида исследовалась на альтернативных биологических



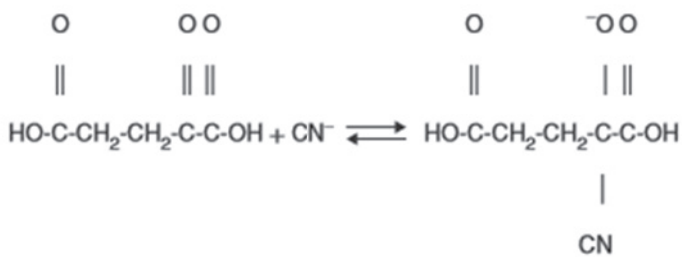


Рис. 4. Схема взаимодействия А-КГ с циан-ионом с образованием нетоксичного циангидрина

моделях, в опытах на мышах, крысах и кроликах.

В клеточных культурах фибробластов легких хомячка китайского, обработанных цианидом, кобинамид более эффективно восстанавливал клеточную респираторную активность и полностью инвертировал цианид-индуцированное ингибирование роста клеток по сравнению с гидроксокобаламином. В опытах на *Drosophila melanogaster* кобинамид также проявлял более выраженную антицианидную активность, чем гидроксокобаламин [14].

По данным F. Chan, et al. [15], M. Brenner, et al. [16, 17] кобинамид показал высокую защитную эффективность (превышающую эффективность гидроксокобаламина или комбинации тиосульфата натрия и нитрита натрия) в экспериментах на мышах, крысах и кроликах. При этом ингаляционный и/или внутрикостный путь введения обеспечивал быструю (сопоставимую с внутривенной инъекцией) доставку эффективных доз препарата в системную циркуляцию.

Прогнозируемая эффективная и безопасная доза кобинамида для человека, рассчитанная на основании полученных в эксперименте данных, составляет 10–15 мг/кг.

*Детоксикация цианидов посредством образования нетоксичных циангидринов.* К перспективному направлению создания принципиально нового перорального лечебно-профилактического антидота цианидов относятся исследовательские работы с производными 2-оксокарбоновых кислот, образующих с цианидами малотоксичные циангидрины. В 1997 г. в качестве антидота цианидов в США была запатентована 2-оксопропандиоловая кислота [18]. В тексте к патенту указано, что препарат активен в дозе 0,2 г/кг при внутрибрюшинном способе введения, профилактически защищает от  $DC_{50}$  цианидов. Дальнейшего продолжения работ с этим препаратом не последовало, что, вероятно, связано с недостаточной стабильностью 2-оксопропандиоловой кислоты.

В одном из первых сообщений, касающихся экспериментальной оценки возможности использования  $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты (А-КГ) в качестве антидота цианидов, констатировалось,

что препарат, как в изолированном виде, так и в комбинации с тиосульфатом натрия, обладает статистически достоверным терапевтическим эффектом [19].

Механизм антагонизма А-КГ с цианидом был описан J.S. Norris et al. [20]. Цианид, являясь высокорекреативным нуклеофилом, связывает  $CN^-$ -ионы в сосудистом русле с образованием нетоксичного комплекса циангидрина (рис. 4), снижая их поступление к тканям-мишеням, что, в свою очередь, уменьшает тканевую гипоксию [21].

Первые подробные экспериментальные данные, свидетельствующие о высокой антидотной активности А-КГ при цианидной интоксикации в опытах на мышах были предоставлены [22]. В дальнейшем антидотная эффективность А-КГ была подтверждена в экспериментах на собаках [20]. Результаты экспериментов показали, что антицианидная активность А-КГ превышает таковую диметиламинофенола, дикообальта ЭДТА и тиосульфата натрия и сопоставима с активностью гидроксокобаламина [23].

Установлено так же, что А-КГ при пероральном способе введения крысам до введения цианогенов в дозах  $CD_{50}$  успешно защищает от отравления ацетонитрилом, акрилонитрилом, малонитрилом, пропионитрилом и нитропруссидом натрия [24].

При сравнительном исследовании защитной эффективности различных карбонильных соединений и их метаболитов в отношении цианогенов (ацетонитрила, акрилонитрила, малонитрила, пропионитрила, нитропруссиды натрия, калия феррицианида) в опытах на крысах было показано что наиболее высокой антицианидной активностью обладала кетоглутаровая кислота. Максимальный индекс защиты (ИЗ=5,6) отмечался на фоне отравления малонитрилом и пропионитрилом [25].

Экспериментально-теоретическое обоснование возможности использования А-КГ, как перорального антидота цианидов было дано R. Bhattacharya [24].

R. K. Tulsawani, et al. [26] продемонстрировали высокую антицианидную активность А-КГ при пероральном введении и предложил использовать его в качестве потенциального профилактического антидота при чрезвычайных ситуациях, сопровождающихся выбросом цианидов в окружающую среду. Согласно доклиническим исследованиям, эффективная доза А-КГ составила 2,0 г/кг; в исследованиях на добровольцах эта доза уменьшена до 150 мг/кг массы тела при условиях поддержания достаточной гидратации [27].

Многими исследователями обращалось внимание на цитопротекторные эффекты А-КГ, оцениваемые по цианид-индуцированной цитотоксичности на изолированных клеточных куль-

турах [28-31]. При сочетанном применении *A-KG* с *N*-ацетилцистеином удается избежать цитотоксичности и окислительного стресса, инициируемых цианидом [32, 33]. Подбор оптимальных рецептур на основе *A-KG* представляется перспективным направлением совершенствования антидотной терапии острых отравлений цианидами.

**Заключение.** Результаты экспериментальных исследований, выполненных в последние

годы, свидетельствуют, что на роль потенциальных антидотов цианидов, эффективных при внутримышечной, внутрикостной инъекциях и ингаляционной доставке, претендуют: субстрат 3-МРСТ Сульфанген (*Sulfangen sodium*) и предшественник витамина В<sub>12</sub> Кобинамид (*Cobinamide*). В качестве перспективных пероральных антидотов цианидов рассматриваются препараты на основе α-кетоглутаровой кислоты

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES:

- Hall A. H., Saiers J., Baud F. Which cyanide antidote? // *Crit. Rev. Toxicol.* – 20 – 541-52.
- Baud F. Cyanide: critical issues in diagnosis and treatment // *Human Exp. Toxicol.* – 20 – 191-201.
- Nagasawa H. T., Goon D. J., Crankshaw D. L. Novel, orally effective cyanide antidotes // *J. Med. Chem.* – 20 – Vol. 50, No. – P. 6462-6464.
- Brenner M., Lim J. G., Lee J., et al. Sulfanegen sodium treatment in a rabbit model of sub-lethal cyanide toxicity // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 20 – 2 – 269-76.
- Belani K. G., Singh H., Beebe D. S., et al. Cyanide toxicity in juvenile pigs and its reversal by a new prodrug, sulfanegen sodium // *Anesth. Analg.* – 20 – 114 (5). – 956-61.
- Clemedson C. J., Hultman H. I., Sorbo B. The antidote effect of some sulfur compounds and rhodanese in experimental cyanide poisoning // *Acta Physiol. Scand.* – 19 – 245-51.
- Way J. L., Cannon E., Leung P., et al. Antagonism of cyanide intoxication with rhodanese encapsulated resealed erythrocytes // *Adv. Biosci.* – 19 – 207-11.
- Petrikovics, I., Cannon, E. P., McGuinn, W. D., et al. Cyanide antagonism with carrier erythrocytes and organic thiosulfonates // *Fundam. Appl. Toxicol.* – 19 – 86-93.
- Petrikovics I., Budal M., Baskin S. I., et al. Characterization of liposomal vesicles encapsulating rhodanese for cyanide antagonism // *Drug. Deliv.* – 20 – 312-19.
- Szczepkowski T. W., Wood J. L. The cystathionase rhodanese system // *Biochim. Biophys. Acta.* – 19 – 1 – 469-78.
- Baskin S. I., Porter D. W., Rockwood G. A., et al. In vitro and in vivo comparison of sulfur donors as antidotes to acute cyanide intoxication // *J. Appl. Toxicol.* – 19 – 19 (3). – P. 173-182.
- Chan A., Balasubramanian M., Blackledge W., et al. Cobinamide is superior to other treatments in a mouse model of cyanide poisoning // *Clin. Toxicol. (Phila.)* – 20 – 709-17.
- Hayward G. C., Hill H. A. O., Pratt J. M., et al. The chemistry of vitamin BPart IV: The thermodynamic trans effect // *J. Chem. Soc.* – 19 – 6485-93.
- Broderick K. E., Potluri P., Zhuang S., et al. Cyanide detoxification by the cobalamin precursor cobinamide // *Exp. Biol. Med.* Maywood. – 20 – 2 – 641-9.
- Chan A., Crankshaw D. L., Monteil A., et al. The combination of cobinamide and sulfanegen is highly effective in mouse models of cyanide poisoning // *Clin. Toxicol. (Phila.)* – 20 – 366-73.
- Brenner M., Kim J. G., Mahon S. B., et al. Intramuscular cobinamide sulfate in a rabbit model of sublethal cyanide toxicity // *Ann. Emerg. Med.* – 20 – 352-62.
- Brenner M., Mahon S. B., Lee J., et al. Comparison of cobinamide to hydroxocobalamin in reversing cyanide physiologic effects in rabbits using diffuse optical spectroscopy monitoring // *J. Biomed. Opt.* – 20 – 017001.
- Patent № 5674904, Method for the treatment of cyanide poisoning, Oct. 7, 1997.
- Schwartz C., Morgan R. L., Way L. M. et al. Antagonism of cyanide intoxication with sodium pyruvate // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 19 – Vol. – P. 437-441.
- Norris J. C., Utley W. A., Hume A. S. Mechanism of antagonising cyanide induced lethality by -ketoglutarate acid // *Toxicology.* – 19 – 3-9.
- Hume A. S., Moore S. J., Hume A. T. Effects of alpha-ketoglutaric acid on the distribution of cyanide and acidosis associated with cyanide intoxication // *Toxicologist.* – 19 – P. 98.
- Moore S. J., Norris J. C., Ho I. K., Hume A. S. The efficacy of -ketoglutaric acid in the antagonism of cyanide intoxication // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 19 – 40-4.
- Kravzov J., Rios C, Altagracia M., Jimenez D. Comparison of cobalt edetate and alpha-ketoglutarate as antidotes against cyanide intoxication in mice // *Proc. West. Pharmacol. Soc.* – 19 – 43-4.
- Bhattacharya R., Satpute R. M., Hariharakrishnan J., et al. Acute toxicity of some synthetic cyanogens in rats and their response to oral treatment with alpha-ketoglutarate // *Food. Chem. Toxicol.* – 20 – 2314-20.
- Bhattacharya R., Niranjan L. Protective efficacy of various carbonyl compounds and their metabolites, and nutrients against acute toxicity of some cyanogens in rats: biochemical and physiological studies // *Interdisciplinary Toxicology.* – 20 – Vol. 10 (1). – 1-10.
- Tulsawani R. K., Kumar D., Bhattacharya R. Effect of pretreatment of -ketoglutarate on cyanide-induced toxicity and alterations in various physiological variables in rodents // *Biomed. Environ. Sci.* – 20 – 56-63.
- Mittal G., Singh T., Kumar N., et al. Radiolabeling and dose fixation study of oral alpha-ketoglutarate as a cyanide antidote in healthy human volunteers // *Clin. Toxicol.* – 20 – 509-15.
- Niknahad H., Khan S., Sood C., O'Brien P. Prevention of cyanideinduced cytotoxicity by nutrients in isolated rat hepatocytes // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 19 – 1 – 271-9.
- Hariharakrishnan J., Satpute R. M., Prasad G. B. K. S., Bhattacharya R. Oxidative stress mediated cytotoxicity of cyanide in LLC-MK2 cells and its attenuation by Alpha-ketoglutarate and N-acetyl cysteine // *Toxicol. Lett.* – 20 – 1 – 132-41.
- Hariharakrishnan J., Satpute R. M., Bhattacharya R. Cyanideinduced changes in the levels of neurotransmitters in discrete brain regions of rats and their response to oral treatment with
- ketoglutarate // *Indian J. Exp. Biol.* – 20 – 731-6.
- Bhattacharya R., Tulsawani R. K. In vitro and in vivo evaluation of various carbonyl compounds against cyanide toxicity with particular reference to alpha-ketoglutaric acid // *Drug Chem. Toxicol.* – 20 – 149-61.
- Satpute R. M., Hariharakrishnan J., Bhattacharya R. Effect of alpha-ketoglutarate and N-acetyl cysteine on cyanideinduced oxidative stress mediated cell death in PC12 cells
- // *Toxicol. Ind. Health.* – 20 – 297-308.
- Satpute R. M., Hariharakrishnan J., Lomash V., et al. Oxidative stress and tissue pathology caused by subacute exposure to ammonium acetate in rats and their response to treatments with alpha-ketoglutarate and N-acetyl cysteine // *Toxicol. Ind. Health.* – 20 – DOI:10.1177/0748233712448117.

V.D. Gladkikh, G.V. Verzhinina

## POTENTIAL DIRECTIONS OF THE IMPROVEMENT OF ANTIDOTE THERAPY OF CYANIDE POISONING

Research and Production Center “Pharmaceutical Protection”, Federal Medical Biological Agency, 141402, Khimki, Russian Federation

The article on the basis of an analysis of the literature discusses promising areas for the development of antidote prophylaxis and treatment of acute cyanide poisoning. The chemical compounds mediating anticyanide activity by stimulating the main detoxification mechanisms of endogenous cyanide: sulfanegen, cobinamide, α-ketoglutaric acid claimed to be potential cyanide antidotes, effective and safe for intramuscular and intraosseous injections, inhalation and oral administration.

**Keywords:** *antidotes, detoxification, cobinamide, toxicity, sulfanegen, cyanide, α-ketoglutaric acid.*

Материал поступил в редакцию 23.04.2019 г.

УДК 615.2

# АГОНИСТЫ РЕЦЕПТОРОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ СО СЛЕДОВЫМИ АМИИНАМИ, 1-ГО ПОДТИПА КАК ПОТЕНИЦАЛЬНАЯ МИШЕНЬ В ТЕРАПИИ ПСИХИЧЕСКИХ РАССТРОЙСТВ С НАРУШЕНИЯМИ ИМПУЛЬСИВНОКОМПУЛЬСИВНОГО КОНТРОЛЯ

И.М. Суханов

Институт фармакологии  
им. А.В. Вальдмана, Первый  
Санкт-Петербургский  
государственный  
медицинский университет  
им. акад. И.П. Павлова,  
197101, г. Санкт-Петербург,  
Российская Федерация

**Р**ецепторы, ассоциированные со следовыми аминами, 1-го подтипа (TAAR1) — перспективная мишень для разработки новых фармакологических подходов к терапии различных нейropsychических расстройств. В настоящее время TAAR1 агонисты проходят клинические испытания как новые фармакологически активные агенты с антипсихотическим действием. При этом экспрессия TAAR1 и физиологическое значение этих рецепторов, как регуляторов активности катехоламинергических структур в ЦНС, позволяют предположить, что активация TAAR1 может оказывать терапевтическое действие у больных, страдающих такими психическими заболеваниями как обсессивно-компульсивное расстройство и синдром дефицита внимания с гиперактивностью, которые сопровождаются нарушениями импульсивнокомпульсивного контроля. Настоящая работа представляет собой попытку критической оценки существующего на данный момент массива данных, полученных в ходе тестирования TAAR1 лигандов в *in vivo* работах за последние 5 лет. Проведённый анализ позволяет предположить, что TAAR1 агонисты могут оказывать противокompulsивное и иметь ограниченное противоимпульсивное действие при использовании в клинике.

**Ключевые слова:** TAAR1, СДВГ, ОКР, дофамин, серотонин, доклинические исследования.

**Введение.** Рецепторы, ассоциированные со следовыми аминами, 1-го подтипа (trace amines associated receptors 1, TAAR1) — метаботропные рецепторы, которые принадлежат к большому семейству рецепторов, сопряжённых с G-белком. TAAR1 были обнаружены относительно недавно [1,2]. Известно, что эндогенными агонистами этих рецепторов являются соединения из гетерогенной группы веществ, которые в силу низкого содержания в тканях позвоночных принято называть следовыми аминами [3].

Экспрессия TAAR1 была обнаружена в ряде катехоламинергических структур ЦНС, включая префронтальную кору, прилежащее ядро перегородки, чёрное вещество, вентральную

область покрышки среднего мозга, ядра шва и голубое пятно [4–6].

В нескольких работах с TAAR1 лигандами было убедительно показано, что выключение этих рецепторов (у генетически-модифицированных животных) приводит *in vivo* к повышению чувствительности к двигательным эффектам психостимуляторов [7–11], механизм которых, как принято считать, связан с повышением дофаминовой нейротрансмиссии в мезолимбическом пути [12]. На клеточных культурах было показано, что фармакологическая активация TAAR1 снижает спонтанную электрическую активность дофаминергических нейронов вентральной области перегородки и серотонинергических нейронов дорсально-

го ядра шва, при этом введение TAAR1 антагониста, EPPTB, предотвращало это действие TAAR1 агонистов [13–15].

Хорошо известно, что патогенез многих нейropsychических расстройств связан с нарушением катехоламинергической нейротрансмиссии в ЦНС. Учитывая, что использование прямых агонистов и антагонистов рецепторов к катехоламинам сопряжено с высоким риском развития побочных эффектов, чрезвычайно важным с точки зрения разработки новых подходов к терапии нейropsychических расстройств является возможность применять в клинике фармакологически активные вещества, которые «мягко» модулируют катехоламинергическую нейротрансмиссию. С этой точки зрения TAAR1 представляются перспективной фармакологической мишенью и в настоящее время в клинических исследованиях находятся уже два соединения, которые активируют TAAR1 [16]. Тем не менее остаётся открытым вопрос о потенциальном терапевтическом значении агонистов TAAR1 в лечении больных, страдающих такими психическими заболеваниями как обсессивно-компульсивное расстройство (ОКР) и синдром дефицита внимания с гиперактивностью (СДВГ), патогенез которых также связан с изменениями в катехоламинергической нейротрансмиссии [17,18].

#### *Обсессивно-компульсивное расстройство и активация TAAR1*

Одним из наиболее характерных симптомов ОКР у пациентов является возникновение компульсий, навязчивых действий, которые больные совершают, чтобы уменьшить тревогу [19]. В доклинических исследованиях для моделирования компульсивного поведения зачастую используют феномен полидипсии, обусловленной режимом пищевого подкрепления [20]. В основе этой модели лежит возникновение навязчивого питья у голодных крыс, помещённых в интервальный режим пищевого подкрепления. В исследованиях, которые проводили в ПСПбГМУ им. академика И.П. Павлова, было обнаружено, что острое введение высокоселективного частичного агониста TAAR1 RO5263397 (1–10 мг/кг, внутривентрикулярно (в/в)) дозозависимо снижало полидипсию, вызванную двумя различными режимами пищевого подкрепления: «фиксированное время 60 секунд» и «фиксированный интервал 60 секунд» [21]. В опытах с повторным введением RO5263397 (1,6 мг/кг, дважды в сутки, в/в) было показано, что выявленное противокompульсивное действие сохраняется на протяжении 7 дней, что может указывать на то, что к этому фармакологическому эффекту может не развиваться толерантность [21]. В нескольких

контрольных экспериментах было установлено, что острое введение фармакологического агента вызывает снижение двигательной активности и нарушение питьевого поведения у крыс, было показано, однако, что повторное введение RO5263397 животным приводило к развитию толерантности к этим эффектам [21].

Данные о потенциальном противокompульсивном действии RO5263397 подтверждают результаты опытов с RO5256390, полным агонистом TAAR1. Было показано, что под действием RO5256390 у крыс снижалось компульсивное поедание пищи [22]. Более того, в ещё одной работе было отмечено, что введение другого полного агониста TAAR1 RO5203648 было способно снижать компульсивное поведение у крыс, нокаутных по гену дофаминавого транспортера (DAT), хотя авторы подчёркивают возможность других интерпретаций, полученных ими поведенческих данных [23].

#### *Синдром дефицита внимания с гиперактивностью и активация TAAR1*

Клиническая картина СДВГ включает повышенную двигательную активность, проблемы внимания, а также для пациентов, страдающих этим заболеванием, характерна повышенная импульсивность [24]. Из предшествующих работ известно, что одной из самых валидных моделей СДВГ в доклинических исследованиях являются мыши, нокаутные по гену DAT (DAT-KO) [25]. Выключение этого гена у животных приводит к развитию выраженной базальной гиперактивности, которая снижается под действием амфетамина, психостимулятора, который часто используют для терапии подростков, страдающих СДВГ [11]. При оценке двигательной активности мышей, у которых были одновременно выключены гены TAAR1 и DAT, было обнаружено, что базальная локомоторная активность таких животных была статистически значимо выше, чем у DAT-KO мышей [26]. При этом введение TAAR1 агонистов RO5203648 и RO5166017 снижало активность у DAT-KO мышей [13,26].

В недавно опубликованном исследовании с новой генетической моделью СДВГ DAT-KO крысами [27] было продемонстрировано, что другой TAAR1 агонист RO5263397 также способен снижать гиперактивность у DAT-KO животных.

Влияние TAAR1 на внимание до сих пор недостаточно хорошо исследовано в опытах *in vivo*. В двух оператных методиках: тест для оценки внимания «пять отверстий» и двухпедальный тест для оценки внимания, было установлено, что введение RO5263397 (1-10 мг/кг, в/в) не оказывало статистически значимого воздействия

на аккуратность выполнения животными оперантных тестов [28,29].

Необходимо, однако, отметить, что в этих исследованиях оценку внимания проводили на крысах без нарушений внимания, таким образом, вопрос о фармакологических эффектах активации TAAR1 у модельных животных со сниженным вниманием остаётся открытым.

Под импульсивностью принято понимать склонность действовать без достаточного сознательного контроля, под влиянием внешних обстоятельств или в силу эмоциональных переживаний. В доклинических исследованиях выделяют несколько типов импульсивности: снижение тормозного контроля над поведением, сниженная чувствительность к задержке подкрепления и преждевременное принятие решений [30]. Для моделирования различных видов импульсивности используют различные поведенческие методики. К настоящему времени есть убедительные экспериментальные свидетельства, что активация TAAR1 может усиливать ингибиторный контроль у животных. Так, два TAAR1 агониста, RO5263397 и RO5256390, увеличивали число подкреплений, которые получали макаки в тесте «избирательное подкрепление поведения с низкой частотой» [13]. Аналогичные результаты были получены при тестировании действия RO5256390, RO5203648 и RO5263397 в задаче поиска объекта [13,26].

Кроме того, было установлено, что активация TAAR1 усиливает ингибиторный контроль у мышей при оценке их поведения на классическом оперантном режиме пищевого подкрепления «фиксированный интервал 30 секунд» [5]. Введение как RO5166017 (0,1-1 мг/кг, в/б), так и RO5203648 (0,03-0,3 мг/кг, в/б) дозозависимо уменьшало число преждевременных нажатий у мышей. Важно отметить, что эффекты RO5203648 не были обнаружены, когда в этом же тесте препарат вводили мышам, нокаутным по гену TAAR1 [5]. Эти данные подчёркивают, что выявленное противоимпульсивное действие TAAR1 агонистов было связано именно с активацией этих рецепторов.

Влияние TAAR1 агонистов на два других типа импульсивности изучены не так подробно. Было установлено, что введение RO5263397 (1-10 мг/кг, в/б) практически не влияло на чувствительность крыс к задержке подкрепления [28,29].

При линейном регрессионном анализе удалось обнаружить статистически значимый эффект всего одной дозы препарата (1 мг/кг, в/б) [29]. Похожим образом, RO5203648 не оказывал влияние на поведение животных в похожем тесте с оперантной панелью, которую устанавливали в домашних клетках животных [23]. Два вышеупомянутых теста для оценки внимания у крыс позволяют оценить фармакологическое воздействие на преждевременное принятие решений у крыс. В обоих случаях авторам не удалось обнаружить эффекты RO5263397 на этот вид импульсивности. Однако в работе Хуе и коллег было продемонстрировано, что введение RO5263397 предотвращало повышение преждевременного принятия решений, вызванного отменой метамфетамина [28].

**Заключение.** В целом результаты экспериментов свидетельствуют о том, что активация TAAR1 может снижать компульсивное поведение у крыс и что к этому эффекту не развивается толерантность, следовательно, можно прогнозировать клиническую эффективность агонистов TAAR1 при лечении ОКР. Результаты доклинических исследований агонистов TAAR1 позволили установить, что эти соединения могут снижать гиперактивность, а также некоторые виды импульсивности. Хотя вопрос о том, может ли активация TAAR1 восстанавливать нарушения внимания, по-прежнему открыт, в целом можно сделать вывод, что агонисты TAAR1 — перспективная группа фармакологически активных веществ для дальнейшей разработки препаратов для терапии СДВГ.

Работа над обзором поддержана грантом РНФ № 17-75-20177.

Автор декларирует отсутствие конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/REFERENCES:

- Borowsky B, Adham N, Jones KA, Raddatz R, Artymyshyn R, Ogozalek KL, et al. Trace amines: Identification of a family of mammalian G protein-coupled receptors. *Proc Natl Acad Sci.* 2001; 98 (16): 8966-71.
- Bunzow JR, Sonders MS, Arttamangkul S, Harrison LM, Zhang G, Quigley DI, et al. Amphetamine, 3,4-methylenedioxymethamphetamine, lysergic acid diethylamide, and metabolites of the catecholamine neurotransmitters are agonists of a rat trace amine receptor. *Mol Pharmacol.* 2001; 60 (6): 1181-9.
- Rutigliano G, Accorroni A, Zucchi R. The case for TAAR1 as a modulator of central nervous system function. *Front Pharmacol.* 2018; 8: 1-10.
- Lindemann L, Meyer CA, Jeanneau K, Bradaia A, Ozmen L, Bluethmann H, et al. Trace Amine-Associated Receptor 1 Modulates Dopaminergic Activity. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008; 324 (3): 948-56.
- Espinoza S, Lignani G, Caffino L, Maggi S, Sukhanov I, Leo D, et al. TAAR1 Modulates Cortical Glutamate NMDA Receptor Function. *Neuropsychopharmacology.* 2015; 40 (9): 2217-27.
- Xie Z, Westmoreland S V., Bahn ME, Chen G-L, Yang H, Vallender EJ, et al. Rhesus Monkey Trace Amine-Associated Receptor 1 Signaling: Enhancement by Monoamine Transporters and Attenuation by the D2 Autoreceptor in Vitro. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007; 321 (1): 116-27.
- Wolinsky TD, Swanson CJ, Smith KE, Zhong H, Borowsky B, Seeman P, et al. The Trace Amine 1 receptor knockout mouse: An animal model with relevance to schizophrenia. *Genes, Brain Behav.* 2007; 6 (7): 628-37.
- Sotnikova TD, Caron MG, Gainetdinov RR. Trace Amine-Associated Receptors as Emerging Therapeutic Targets. *Mol Pharmacol.* 2009; 76 (2): 229-37.

9. Achat-Mendes C, Lynch LJ, Sullivan KA, Vallender EJ, Miller GM. Augmentation of methamphetamine-induced behaviors in transgenic mice lacking the trace amine-associated receptor Pharmacol Biochem Behav. 2012; 101 (2): 201–7.
10. Di Cara B, Maggio R, Aloisi G, Rivet J-M, Lundius EG, Yoshitake T, et al. Genetic Deletion of Trace Amine 1 Receptors Reveals Their Role in Auto-Inhibiting the Actions of Ecstasy (MDMA). J Neurosci. 2011; 31 (47):16928–40.
11. Sukhanov I, Caffino L, Efimova E V., Espinoza S, Sotnikova TD, Cervo L, et al. Increased context-dependent conditioning to amphetamine in mice lacking TAARPharmacol Res. 2016; 103: 206–14.
12. Zetterström T, Sharp T, Marsden CA, Ungerstedt U. In Vivo Measurement of Dopamine and Its Metabolites by Intracerebral Dialysis: Changes After d-Amphetamine. J Neurochem. 1983; 41 (6): 1769–
13. Revel FG, Moreau JL, Pouzet B, Mory R, Bradaia A, Buchy D, et al. A new perspective for schizophrenia: TAAR1 agonists reveal antipsychotic- and antidepressant-like activity, improve cognition and control body weight. Mol Psychiatry. 2013; 18 (5): 543–56.
14. Revel FG, Moreau J-L, Gainetdinov RR, Bradaia A, Sotnikova TD, Mory R, et al. TAAR1 activation modulates monoaminergic neurotransmission, preventing hyperdopaminergic and hypoglutamatergic activity. Proc Natl Acad Sci. 2011; 108 (20): 8485–90.
15. Revel FG, Meyer CA, Bradaia A, Jeanneau K, Calcagno E, André CB, et al. Brain-specific overexpression of trace amine-associated receptor 1 alters monoaminergic neurotransmission and decreases sensitivity to amphetamine. Neuropsychopharmacology. 2012; 37 (12): 2580–
16. Bery MD, Gainetdinov RR, Hoener MC, Shahid M. Pharmacology of human trace amine-associated receptors: Therapeutic opportunities and challenges. Pharmacol Ther. 2017; 180: 161–80.
17. Curatolo P, D'Agati E, Moavero R. The neurobiological basis of ADHD. Ital J Pediatr. 2010; 36 (1): 79.
18. Koo M-S, Kim E-J, Roh D, Kim C-H. Role of dopamine in the pathophysiology and treatment of obsessive-compulsive disorder. Expert Rev Neurother. 2010; 10 (2):275–90.
19. Seibell P, Hollander E. Management of Obsessive-Compulsive Disorder. F1000Prime Rep. 2014; 6: 1–6.
20. Platt B, Beyer CE, Schechter LE, Rosenzweig-Lipson S. Schedule-Induced Polydipsia: A Rat Model of Obsessive-Compulsive Disorder. In: Current Protocols in Neuroscience. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 20p. 1–8.
21. Sukhanov I, Dorotenko A, Dolgorukova A, Hoener MC, Gainetdinov RR, Beshpalov AY. Activation of trace amine-associated receptor 1 attenuates schedule-induced polydipsia in rats. Neuropharmacology. 2019; 144; 184–
22. Ferragud A, Howell AD, Moore CF, Ta TL, Hoener MC, Sabino V, et al. The Trace Amine-Associated Receptor 1 Agonist R05256390 Blocks Compulsive, Binge-like Eating in Rats. Neuropsychopharmacology. 2017; 42 (7): 1458–
23. Cinque S, Zoratto F, Poleggi A, Leo D, Cerniglia L, Cimino S, et al. Behavioral phenotyping of dopamine transporter knockout rats: Compulsive traits, motor stereotypies, and anhedonia. Front Psychiatry. 2018; 9: 1–
24. Sagvolden T, Johansen EB. Rat Models of ADHD. In: Current topics in behavioral neurosciences [Internet]. 20p. 301–15.
25. Jones SR, Gainetdinov RR, Wightman RM, Caron MG. Mechanisms of amphetamine action revealed in mice lacking the dopamine transporter. J Neurosci. 1998; 18 (6): 1979–86.
26. Revel FG, Moreau JL, Gainetdinov RR, Ferragud A, Velázquez-Sánchez C, Sotnikova TD, et al. Trace amine-associated receptor 1 partial agonism reveals novel paradigm for neuropsychiatric therapeutics. Biol Psychiatry. 2012; 72 (11): 934–42.
27. Leo D, Sukhanov I, Zoratto F, Illiano P, Caffino L, Sanna F, et al. Pronounced Hyperactivity, Cognitive Dysfunctions, and BDNF Dysregulation in Dopamine Transporter Knock-out Rats. J Neurosci. 2018; 38 (8): 1959–72.
28. Xue Z, Siemian JN, Johnson BN, Zhang Y, Li JX. Methamphetamine-induced impulsivity during chronic methamphetamine treatment in rats: Effects of the TAAR 1 agonist R052633Neuropharmacology. 2018; 129: 36–46.
29. Sukhanov I, Dorotenko A, Bortnikov N, Tur M, Dolgorukova A, Dorofeikova M, et al. Evaluation of effects of the TAAR1 partial agonist R05263397 on executive cognitive functions. Eur Neuropsychopharmacol. 2019; 29: S261–2.
30. Evenden JL. Varieties of impulsivity. Psychopharmacology (Berl). 1999; 146 (4): 348–61.

I.M. Sukhanov

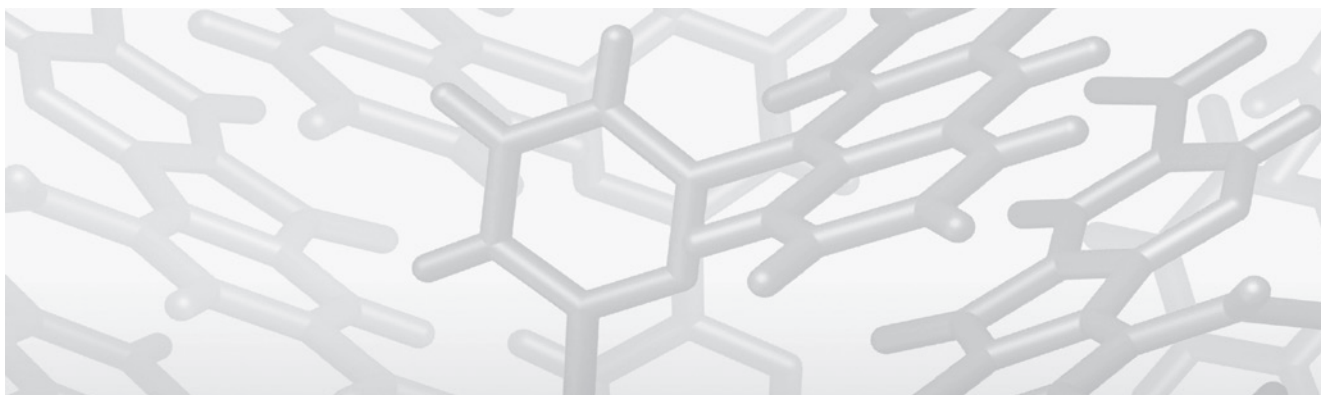
## TAAR1 AGONISTS AS A POTENTIAL TARGET IN THE THERAPY OF MENTAL DISORDERS WITH THE DEFICIT OF IMPULSIVE AND COMPULSIVE CONTROL

A.V. Valdman Institute of Pharmacology, I.P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, 197101, Saint Petersburg, Russian Federation

Receptors associated with trace amines, 1<sup>st</sup> subtype (TAAR1), are the promising targets for the development of new pharmacological approaches to the treatment of various neuropsychiatric disorders. Currently TAAR1 agonists are undergoing clinical trials as new pharmacologically active agents with antipsychotic action. At the same time, the expression of TAAR1 and the physiological significance of these receptors as regulators of the activity of catecholaminergic structures in the Central nervous system suggest that the activation of TAAR1 can have a therapeutic effect in patients suffering from mental diseases such as obsessive-compulsive disorder and attention deficit hyperactivity disorder, which are accompanied by violations of impulsive and compulsive control. This paper is an attempt to critically evaluate the currently existing data set obtained during testing of TAAR1 ligands in in vivo studies over the past 5 years. The analysis suggests that TAAR1 agonists may provide and have a limited anti-compulsive effect when used in the clinic.

**Keywords:** TAAR1, ADHD, OCD, dopamine, serotonin, preclinical studies.

Материал поступил в редакцию 23.04.2019 г.



УДК 615.015.36 : 546.655

# ОСТРАЯ ТОКСИЧНОСТЬ НАНОЧАСТИЦ ДИОКСИДА ЦЕРИЯ

*Н.В. Ходыкина, Л.П. Точилкина, О.Н. Новикова,  
М.С. Срослов, А.Я. Почепцов, Ю.И. Великородная*

Федеральное государственное унитарное предприятие «Научно-исследовательский институт гигиены, токсикологии и профпатологии» Федерального медико-биологического агентства (ФГУП «НИИ ГТП» ФМБА России), 400048, г. Волгоград, Российская Федерация

**И**зучены резорбтивные эффекты 0,01 М золя нанодиоксида церия при однократном интраперитонеальном введении крысам. Установлено, что острое воздействие наночастиц оказывает на организм дозозависимое общетоксическое действие (снижение массы тела, воспалительные изменения органов брюшной полости, модификация индивидуального поведения, гематологические сдвиги, нарушение регуляции обмена веществ), развивающееся на фоне активации ПОЛ. Прооксидантное действие наночастиц диоксида церия демонстративно проявляется на относительно высоких (80 – 8 мг/кг) уровнях экспозиции. Пороговой по общетоксическому эффекту ( $Lim_{ch}^{integr}$ ) признана доза 0,8 мг/кг.

**Ключевые слова:** нанодиоксид церия, крысы, острая токсичность, прооксидантное действие, антиоксидантное действие.

**Введение.** Термин «наноантиоксиданты», появившийся в отечественной научной литературе немногим более 10 лет назад [1,2], в настоящее время ассоциируется уже с вполне сформировавшейся инновационной фармакологической стратегией поиска потенциальных антиоксидантов среди продуктов нанотехнологий [3,4]. Данный подход представляется несколько парадоксальным, если учесть, что в качестве универсальной основы повреждающего действия наноматериалов (НМ) признаётся разрушительный оксидативный стресс, провоцируемый их прооксидантной активностью [5-7]. Тем не менее, способность проявлять и антиоксидантные свойства подтверждена de facto для наночастиц (НЧ) металлов (золота, платины и даже серебра), оксидов металлов (церия, иттрия, алюминия, марганца), неметаллов (фуллеренов и их производных), органических полимеров и т.д. Некоторым из них антиоксидантная активность присуща per se, другие приобретают её в результате особой функционализации поверхности, третьи служат средствами целевой доставки антиоксидантов к органам-мишеням. В том или ином виде при применении в низких дозах многие НЧ демонстрируют свойства «чистильщиков», нейтрализующих или ослабляющих эффекты свободных радикалов и АФК и смягчающих проявления оксидативного

стресса [8-10]. На этом основании можно полагать, что в будущем НМ, действительно, смогут сформировать новый самостоятельный кластер антиоксидантных препаратов. Для текущего же этапа больше характерно экспансивное накопление релевантной информации в виде результатов скрининговых исследований и пилотных испытаний.

Вместе с тем на фоне обилия исследовательских «эпизодов» отчётливо выделяются работы, отличающиеся преэминентностью и аккумулятивностью знаний в объёме, достаточном для объективной оценки возможности применения в биологии и медицине. К числу таких НМ с высокой степенью изученности следует отнести, в первую очередь, нанодиоксид церия ( $SeO_2$ , НДЦ).

Наличие дефектов кристаллической решетки («кислородных вакансий»), двух стабильных степеней окисления ( $Se^{3+}$  и  $Se^{4+}$ ) и низкая энергия их образования обуславливают уникальную редокс-активность данного соединения, в том числе его антиоксидантное действие в системах in vitro и in vivo. Наряду с выраженной кислородной нестехиометрией, наночастицы  $SeO_2$  обладают таким достоинством, как способность к быстрой регенерации, которая позволяет им, в отличие от классических антиоксидантов, участвовать во внутриклеточных редокс-реакциях многократно, инактивируя широ-

**Ходыкина Нина Владимировна (Khodykina Nina Vladimirovna)**, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории лекарственной безопасности ФГУП «НИИ ГТП» ФМБА России, hodykina@rihtop.ru

**Точилкина Людмила Петровна (Tochilkina Lyudmila Petrovna)**, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник, заведующий лабораторией лекарственной безопасности ФГУП «НИИ ГТП» ФМБА России, tochilkina@rihtop.ru

**Новикова Ольга Николаевна (Novikova Olga Nikolaevna)**, кандидат медицинских наук, вед. научный сотрудник лаборатории лекарственной безопасности ФГУП «НИИ ГТП» ФМБА России, novikova@rihtop.ru

**Срослов Михаил Сергеевич (Sroslov Mikhail Sergeevich)**, научный сотрудник лаборатории лекарственной безопасности ФГУП «НИИ ГТП» ФМБА России, SroslovMS@gmail.com

**Почепцов Александр Яковлевич (Pochepctov Alexander Yakovlevich)**, старший научный сотрудник лаборатории патоморфологии ФГУП «НИИ ГТП» ФМБА России, pochepctov@rihtop.ru

**Великородная Юлия Ивановна (Velikorodnaya Julia Ivanovna)**, заведующий лабораторией патоморфологии ФГУП «НИИ ГТП» ФМБА России, velikorodnaya@rihtop.ru

кий спектр свободных радикалов и АФК. Наличие у НДЦ каталазо- и супероксиддисмутазаподобных свойств также расценивается как явное преимущество в сравнении с традиционными антиоксидантами [3,4,8,9,12-14]. В совокупности перечисленные качества позволяют рассматривать данный НМ как потенциальное лекарственное средство для терапии заболеваний с патогенетической основой в виде оксидативного стресса [8]. Вместе с тем, очевидно, что реализация таких перспектив на практике требует преодоления немалых трудностей [11,14]. Основная их часть, безусловно, связана с оценкой биобезопасности НДЦ.

Известно, что токсические свойства и спектр биологической активности нанодиоксида церия находятся в сложной и неоднозначной зависимости от размера частиц, свойств их поверхности (функционализация, дзета-потенциал), метода синтеза («химической предыстории»), рН биологической среды (в зоне накопления и активности наночастиц) и др. [8,12,14]. Максимально биосовместимыми и безопасными, а потому и наиболее приемлемыми для биомедицинского применения, признаются стабилизированные мальтодекстрином агрегатно-устойчивые гидрозоли с размером наночастиц церия 1-7 нм [8].

Однако и в этом случае способность НДЦ оказывать на баланс окислительно-восстановительных процессов *in vivo* противоположно направленное влияние требует тщательного изучения зависимости вызываемых им эффектов от уровня воздействия с целью обоснованного выбора диапазона доз, в котором вероятность проявления неблагоприятных эффектов НДЦ при фармакологических испытаниях потенциальных лекарственных средств, содержащих его в своём составе, будет сведена к минимуму. Поэтому очевидно, что сведения о парантеральной токсичности НДЦ, являясь необходимой составной частью токсикологической характеристики этого НМ, могут представлять не меньший интерес и для исследований в области экспериментальной терапии с его применением. Результаты собственных исследований, проведённых в этом направлении и тезисно представленных в печати ранее [15], положены в основу настоящей публикации.

**Материалы и методы исследования.** Объектом экспериментального исследования служил образец 0,01 М наноразмерного золя диоксида церия (1,72 мг/мл), синтезированный в Институте общей и неорганической химии им. Н. С. Курнакова РАН и охарактеризованный там же с применением методов УФ-видимой спектроскопии, рентгенофазового анализа, просвечивающей электронной микроскопии и динамического светорассеяния. Согласно результатам анализа, синтезированный коллоидный раствор был практически монодисперсным и содержал сферические НЧ со средним гидро-

динамическим диаметром 6-9 нм в концентрации  $2,4 \times 10^{22}$  мл<sup>-1</sup>.

В качестве биообъекта использовали беспородных белых крыс самцов с массой тела 220-240 г общей численностью 180 особей. Содержание, питание, уход за животными и их умерщвление осуществляли в соответствии с требованиями «Международных рекомендаций по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (ВОЗ, Женева, 1985) и «Правилами лабораторной практики» (Приказ Минздравсоцразвития России от 23 августа 2010 г. №708н).

Золь НДЦ вводили крысам однократно внутрибрюшинно в трёх дозах с десятикратным разрывом между ними: 80,0 мг/кг (экспериментальная серия 1); 8,0 и 0,8 мг/кг (серия 2). Контрольным особям инъецировали физиологический раствор. Длительность наблюдения за животными составляла две недели. На 1, 3, 7 и 14 сутки крыс подвергали инструментальному обследованию, завершавшемуся эвтаназией и вскрытием. О биологической активности НЧ судили по характеру, глубине и динамике изменений показателей, характеризующих состояние целостного организма, функцию печени и почек, а также общий уровень обмена веществ, особенности регуляции основных метаболических путей и эффективность механизмов антиперекисной защиты.

Функциональное состояние организма оценивали с применением интегральных тестов, в число которых входили: масса тела; ЧСС; СПП; мышечная сила – на специализированном приборе «Измеритель силы хватки» («Panlab», Испания); поведенческие реакции – в автоматизированной системе регистрации и идентификации поведенческих актов «LABORAS» («Metris», Нидерланды); параметры крови – на автоматическом гематологическом анализаторе «PCE-210» («ERMA», Япония).

Сравнительному биохимическому анализу подвергали цельную кровь и сыворотку крови подопытных и контрольных крыс. В последней на автоматическом биохимическом анализаторе «Chem Well-2910» («Combi», США) с использованием наборов «Dia Sys» (Германия) и «Диакон-ДС» (Россия) определяли содержание общего белка, альбумина, глюкозы, триглицеридов, холестерина, мочевины, креатинина, общего билирубина, молочной кислоты, активность АЛТ, АСТ, ЩФ, ЛДГ и ГГТ. Определение пировиноградной кислоты (ПВК) осуществляли традиционным спектрофотометрическим методом. Состояние механизмов антиперекисной защиты организма оценивали по содержанию восстановленного глутатиона в цельной крови и конечного продукта ПОЛ – малонового диальдегида (МДА) – в сыворотке.

Биологический материал, полученный при вскрытии животных (головной мозг, сердце, печень, селезёнку, почки, надпочечники, семенники),



Таблица 1

**Статистически значимые патофизиологические изменения у крыс после однократного интраперитонеального введения НДЦ**

Показатели и единицы измерения	Сутки наблюдения	Дозы НДЦ			
		80,0 мг/кг	8,0 мг/кг	0,8 мг/кг	контроль
1	2	3	4	5	6
Интегральные физиологические показатели					
Масса тела, г	3 <sup>1</sup>	234,2±5,3			255,1±4,1
	7 <sup>1</sup>	230,0±4,9			244,4±4,4
	14 <sup>1</sup>	238,8±4,0			254,4±2,9
СПП, В	1 <sup>2</sup>		2,11±0,11		1,82±0,08
	14 <sup>1</sup>	1,95±0,09			2,25±0,07
ЧСС в мин.	1 <sup>1</sup>	452,0±6,1			486,7±13,3
	14 <sup>1</sup>	457,8±16,1			402,2±18,4
Поведенческие реакции за 5-минутный период наблюдения					
Длительность передвижений, сек.	7 <sup>1</sup>	17,63±2,02			27,31±2,48
Время неподвижности, сек.	7 <sup>1</sup>	<b>46,12±11,58</b>			12,21±4,73
Длительность «стоек», сек.	1 <sup>1</sup>	101,40±10,44			161,31±12,79
	1 <sup>2</sup>			149,34±8,06	109,23±15,18
	7 <sup>1</sup>	85,99±11,02			135,00±18,73
Продолжительность груминга, сек	3 <sup>1</sup>	45,56±7,9			18,76±5,62
Количество «стоек»	1 <sup>1</sup>	24,4±2,5			34,7±3,0
	1 <sup>2</sup>			34,3±2,7	24,0±3,3
Частота перемещений	1 <sup>1</sup>	20,2±1,9			30,2±3,2
	1 <sup>2</sup>			26,0±2,2	17,3±2,8
	7 <sup>1</sup>	15,7±1,4			24,5±2,9
Частота груминга	1 <sup>1</sup>	6,5±1,1			3,1±0,8
	3 <sup>1</sup>	7,7±1,1			3,8±1,1
Максимальная скорость, мм/сек	1 <sup>1</sup>	122,6±5,1			162,3±8,9
Пройденная дистанция, м	3 <sup>2</sup>		1,586±0,098		2,353±0,184
	7 <sup>1</sup>	1,260±0,137			1,768±0,182
Количество круговых вращений по часовой стрелке	1 <sup>1</sup>	4,7±0,8			9,3±1,0
	1 <sup>2</sup>			9,1±0,7	6,0±1,0
	7 <sup>1</sup>	4,4±0,7			8,4±1,2
Количество круговых вращений против часовой стрелки	1 <sup>1</sup>	4,7±0,8			8,3±0,9
Продолжительность круговых вращений, сек.	1 <sup>1</sup>	8,32±0,21			7,52±0,26
Средняя скорость круговых вращений, мм/сек.	1 <sup>2</sup>			31,99±0,75	37,53±1,69
Содержание в периферической крови					
лейкоцитов, ·10 <sup>9</sup> /л	14 <sup>1</sup>	<b>17,26±1,21</b>			11,97±0,71
эритроцитов, 10 <sup>12</sup> /л	7 <sup>1</sup>	<b>7,82±0,17</b>			8,50±0,10
	14 <sup>1</sup>	8,11±0,16			8,74±0,20
гемоглобина, г/л	7 <sup>1</sup>	140,1±2,5			149,6±1,7
	14 <sup>1</sup>	137,6±3,8			153,2±4,0

тромбоцитов, 109/л	1 <sup>1</sup>	481,5±11,0			609,7±23,1
	1 <sup>2</sup>		465,0±18,7		593,6±22,5
	3 <sup>1</sup>	<b>417,9±49,3</b>			674,0±27,9
	7 <sup>1</sup>	<b>892,6±34,8</b>			648,5±18,6
	14 <sup>1</sup>	<b>906,9±66,3</b>			697,4±17,8
гематокрит, %	7 <sup>1</sup>	39,88±0,94			42,74±0,47
	14 <sup>1</sup>	39,80±0,94			43,82±1,09
Относительная масса внутренних органов, г/кг					
Головной мозг	1 <sup>1</sup>	7,44±0,17			6,60±0,15
Лёгкие	14 <sup>1</sup>	5,53±0,26			4,87±0,13
Печень	14 <sup>1</sup>	31,91±1,07			28,83±0,76
Селезёнка	3 <sup>1</sup>	5,95±0,28			3,72±0,46
	3 <sup>2</sup>		6,65±0,26		5,81±0,25
	7 <sup>1</sup>	<b>5,14±0,41</b>			3,46±0,26
	7 <sup>2</sup>			7,70±0,56	5,07±0,49
	14 <sup>1</sup>	<b>4,73±0,41</b>			2,73±0,14
Семенники	3 <sup>1</sup>	12,07±0,30			11,03±0,30
	14 <sup>1</sup>	12,63±0,40			10,69±0,44
Надпочечники	1 <sup>1</sup>	<b>0,220±0,013</b>			0,157±0,010
	1 <sup>2</sup>		<b>0,209±0,007</b>		0,161±0,007
	3 <sup>1</sup>	<b>0,196±0,011</b>			0,128±0,004
	3 <sup>2</sup>			0,178±0,007	0,155±0,005
	7 <sup>1</sup>	0,183±0,006			0,161±0,005
	14 <sup>1</sup>	0,187±0,012			0,150±0,008

Примечание: жирным курсивом выделены достоверные сдвиги, выходящие за пределы ( $M \pm 2\sigma$ ) значений контроля; в графе 2 индексы <sup>1,2</sup> обозначают серию экспериментов

обследовали визуально и использовали для определения коэффициентов массы внутренних органов. В случае обнаружения видимых морфологических нарушений изменённые ткани выборочно подвергали гистологическому изучению.

Статистическую обработку результатов проводили с учётом эмпирического распределения анализируемых признаков при помощи пакета Primer of Biostatistics 4.03 с использованием критерия t Стьюдента. Значимыми считали изменения при  $P \leq 0,05$ .

**Результаты и обсуждение.** Динамическое наблюдение за общим состоянием и внешним видом животных показало, что первую неделю крысы, получившие золь в наибольшей дозе (80,0 мг/кг), по сравнению с остальными были значительно более вялыми и имели сниженный мышечный тонус. В других группах после экспозиции НДС клинические признаки интоксикации отсутствовали. Вместе с тем в ходе инструментальных тестирований статистически значимые изменения целого ряда показателей жизнедеятельности, свидетельствовавшие о развитии резорбтивного эффекта, были выявлены на всех уровнях воздействия гидрозоля (табл. 1,2). Обобщение полученного цифрового материала убедительно свидетельствовало, что широта, длительность и динамика наблюдаемых из-

менений определялись величиной введённой дозы наночастиц.

Как и ожидалось, наиболее выраженные нарушения гомеостаза имели место у крыс, экспонированных препаратом в высшей дозе – 80 мг/кг. В этом случае контакт животных с НДС приводил к снижению массы тела, угнетению двигательной и исследовательской активности, нарушениям сердечной деятельности, изменениям в системе красной и белой крови (лейкоцитозу, эритропении, фазовым колебаниям количества тромбоцитов) (табл. 1). Характерный поведенческий паттерн указывал на развитие выраженной стрессорной реакции, которая сопровождалась стабильным увеличением относительной массы надпочечников. Нарушения морфологического состава крови дополнялись стойким увеличением относительной массы селезёнки (табл. 1). На поверхности печени и селезёнки формировались воспалительные гранулёмы, в верхнем этаже брюшины наблюдали инкапсулированные очаги некроза.

Многочисленные биохимические отклонения, затрагивавшие параметры основного обмена, эффективности энергообеспечения и антиперекисной защиты организма регистрировались на протяжении всего постэкспозиционного периода. О прооксидантном действии нанопрепарата свиде-

Таблица 2

## Статистически значимые биохимические сдвиги у крыс после однократного интраперитонеального введения НДС

Показатели и единицы измерения	Сутки наблюдения	Дозы НДС			
		80,0 мг/кг	8,0 мг/кг	0,8 мг/кг	контроль
1	2	3	4	5	6
Мочевина, ммоль/л	3 <sup>1</sup>	2,325±0,291			4,489±0,480
	3 <sup>2</sup>		5,064±0,485		6,545±0,322
	7 <sup>1</sup>	4,299±0,444			5,732±0,423
Щелочная фосфатаза, Е/л	1 <sup>2</sup>		<b>531,7±54,1</b>		326,3±16,8
	3 <sup>1</sup>	<b>1399,0±323,9</b>			512,0±31,2
	1 <sup>1</sup>	<b>340,6±24,2</b>			220,3±12,1
АСТ, Е/л	1 <sup>2</sup>		<b>414,0±27,3</b>		195,8±11,4
	3 <sup>1</sup>	<b>414,5±42,5</b>			261,8±22,7
	14 <sup>1</sup>	<b>218,4±11,6</b>			159,1±9,3
АЛТ, Е/л	7 <sup>1</sup>	106,8±6,0			155,3±10,8
ЛДГ, Е/л	1 <sup>2</sup>		989,2±62,6		645,5±74,5
	3 <sup>1</sup>	925,3±118,5			580,9±62,4
Лактат, ммоль/л	1 <sup>2</sup>		4,736±0,144		4,164±0,198
	7 <sup>1</sup>	4,485±0,174			4,990±0,130
	7 <sup>2</sup>		4,881±0,203		5,563±0,263
ПВК, мкмоль/л	1 <sup>1</sup>	<b>66,19±4,27</b>			42,87±2,04
	3 <sup>1</sup>	<b>48,00±2,01</b>			40,10±1,24
	7 <sup>1</sup>	35,19±1,19			39,07±1,12
	7 <sup>2</sup>		36,19±0,59		39,96±1,19
Лактат/ПВК	1 <sup>1</sup>	74,86±1,12			100,30±4,86
	1 <sup>2</sup>		112,10±4,82		94,35±3,86
	3 <sup>1</sup>	<b>100,60±4,64</b>			127,30±4,10
	7 <sup>2</sup>		131,20±2,81		142,20±4,40
	14 <sup>1</sup>	117,80±1,38			104,70±4,38
Глюкоза, ммоль/л	1 <sup>1</sup>	5,078±0,286			5,981±0,150
	3 <sup>1</sup>	5,976±0,186			6,446±0,123
Общий белок, г/л	1 <sup>2</sup>		76,47±1,48		71,90±1,08
Альбумин, г/л	1 <sup>1</sup>	33,10±0,46			34,67±0,40
	1 <sup>2</sup>			36,98±0,21	35,92±0,54
	3 <sup>1</sup>	<b>31,96±0,27</b>			35,01±0,29
	3 <sup>2</sup>		32,97±0,41		35,08±0,50
	7 <sup>1</sup>	<b>32,16±0,37</b>			36,50±0,35
	14 <sup>1</sup>	33,93±0,52			36,51±0,44
Холестерин, ммоль/л	1 <sup>2</sup>		2,112±0,076		1,711±0,106
	14 <sup>1</sup>	1,874±0,054			1,593±0,045

Триглицериды, ммоль/л	1 <sup>1</sup>	<b>0,959±0,060</b>			0,637±0,031
	1 <sup>2</sup>		0,831±0,042		0,672±0,038
	14 <sup>1</sup>	<b>0,766±0,035</b>			0,449±0,026
	14 <sup>2</sup>		0,717±0,026		0,846±0,029
Восстановленный глутатион, мкмоль/л	1 <sup>2</sup>		1,330±0,098		1,066±0,043
	3 <sup>1</sup>	1,219±0,024			1,121±0,035
	3 <sup>2</sup>		1,346±0,099		1,062±0,069
	3 <sup>2</sup>			<b>1,915±0,050</b>	1,406±0,040
	14 <sup>2</sup>			<b>2,461±0,126</b>	1,279±0,067
ГГТ, Е/л	3 <sup>1</sup>	<b>44,47±7,28</b>			20,58±2,67
МДА, мкмоль/л	11	14,56±0,28			13,33±0,25
	1 <sup>2</sup>		<b>12,86±0,41</b>		9,96±0,37
	3 <sup>1</sup>	<b>16,36±0,39</b>			12,10±0,39
	3 <sup>2</sup>		14,82±0,52		11,97±0,50
	7 <sup>1</sup>	15,87±0,41			13,53±0,41
	7 <sup>2</sup>			9,87±0,37	11,30±0,45
	14 <sup>1</sup>	<b>13,23±0,52</b>			11,31±0,27
Билирубин, мкмоль/л	1 <sup>2</sup>		19,14±0,49		16,50±0,53
	3 <sup>1</sup>	12,21±0,21			11,31±0,36
Креатинин, мкмоль/л	1 <sup>1</sup>	58,88±2,09			52,04±1,40
	1 <sup>2</sup>		<b>58,09±3,80</b>		41,00±1,51
	3 <sup>1</sup>	60,69±1,88			51,46±2,21

Примечание: жирным курсивом выделены достоверные сдвиги, выходящие за пределы ( $M \pm 2\sigma$ ) значений контроля; в графе 2 индексы 1,2 обозначают серию экспериментов

тельствовала, в первую очередь, активация ПОЛ, проявлявшаяся устойчивым статистически значимым ростом МДА и однократным (на 3 сутки) компенсаторным повышением уровня восстановленного глутатиона в крови. На этом фоне при всех тестированиях наблюдались множественные метаболические сдвиги (гипоальбунемия и гипогликемия, рост триглицеридов и холестерина, активация АСТ, ЩФ, ГГТ и ЛДГ), направленность и глубина которых не оставляли сомнений по поводу токсичности испытуемого нанопрепарата (табл. 2). Выраженность негативной реакции на поступление золя сохранялась на достаточно высоком уровне до завершения наблюдений (рис. 1).

Десятикратное снижение дозы НДЦ приводило к существенному ослаблению токсического эффекта. При введении наногидрозоля НДЦ в дозе 8,0 мг/кг изменения интегральных показателей и метаболические нарушения становились значительно менее обширными и продолжительными. Ни значимой потери массы тела, ни асептического воспаления брюшины и патологических изменений органов брюшной полости отмечено не было. Модификация индивидуального поведения проявлялась лишь сокращением пройденной дистанции при втором тестировании, а гематологические нарушения – тромбоцитопенией в начале эксперимента. Повышение относительной массы затраги-

вали только селезёнку (3 и 7 сутки) и надпочечники (1 сутки) (табл. 1). Биохимический профиль сыворотки крыс, экспонированных НДЦ, при снижении дозы НЧ в 10 раз также претерпевал определенные изменения в направлении нормализации (табл. 2). При этом сокращалось как общее количество обнаруженных метаболических сдвигов, так и их стойкость. В результате общее число достоверных отклонений, зарегистрированных у крыс с первых по четырнадцатые сутки после введения НДЦ, сократилось с 78 (80,0 мг/кг) до 26 (8,0 мг/кг), а нарушений, превышающих допустимые физиологические колебания параллельного контроля, – с 24 до 5 соответственно (рис. 2). Вместе с тем, характер и направленность отмеченных сдвигов (включая активацию ПОЛ) практически полностью соответствовали наблюдаемым на высшем уровне экспозиции, указывая на сохранение у НДЦ прооксидантного действия и при десятикратном снижении дозовой нагрузки.

Признаки перехода к качественно иной реакции организма на испытуемый нанопрепарат начали проявляться только при применении наименьшей избранной дозы НДЦ – 0,8 мг/кг, воздействие которой сопровождалось дальнейшим сужением спектра достоверных сдвигов (до 10), абсолютное большинство которых находилось уже в допустимых физиологических границах (табл. 1,2; рис. 1,2).

Кроме того, при практически полной нормализации функционального и метаболического статуса у животных сдвиги целого ряда показателей приобрели инвертированную направленность: обнаруживалось не угнетение, а определённая активация индивидуального поведения (табл. 1); гипоальбуминемия сменялась незначительным (на 3%), но достоверным увеличением содержания альбумина (1 сутки) и, главное, вместо характерного для высоких уровней экспозиции накопления МДА в крови к седьмым суткам эксперимента происходило его падение (на 12,6 %) на фоне существенного роста в крови восстановленного глутатиона (табл. 2). Очевидно, что установленные факты свидетельствовали уже не столько о токсичности НЧ, сколько о «напряжении» адаптационных механизмов экспонированного организма. Не позволяя констатировать безусловную инверсию прооксидантного действия НДЦ, они, однако, указывали на то, что достигнута та «точки перелома» токсического эффекта, когда прооксидантное (относительно слабое) действие НЧ получило адекватный «метаболический ответ» со стороны системы антиперекисной защиты, позволивший избежать выраженных нарушений здоровья.

Анализ представленного выше экспериментального материала даёт основания сделать вывод, что 0,01 М (1,72 мг/мл) гидрозолю НДЦ, содержащий НЧ со средним диаметром 6-9 нм, при однократном интраперитонеальном поступлении в организм способен вызывать интоксикацию с формированием дозозависимого комплекса нарушений. При введении крысам в дозах 80,0 и 8,0 мг/кг общетоксический эффект НДЦ проявляется на фоне стойкой активации ПОЛ и роста концентрации восстановленного глутатиона в крови. Несомненно, пусковым механизмом обнаруженных на всех уровнях организации гомеостатических сдвигов является оксидативный стресс, инициированный прооксидантным действием нанодиоксида церия. Однако последствия контакта с НЧ в минимальной дозе 0,8 мг/кг сводятся исключительно к развитию выраженной адаптивной реакции («пограничный эффект»), что и позволяет признать эту величину близкой к порогу острого токсического действия (*Limac integr*).

С учётом вышеизложенного очевидно, что для изучения потенциальной фармакологической активности нанодиоксида церия в качестве антиоксиданта перспективными являются только низкие уровни экспозиции (менее 0,8 мг/кг в/бр), не приводящие к негативным проявлениям его прооксидантного токсического действия. Для курсового применения, более предпочтительного в практике экспериментальной терапии, оптимальный диапазон фармакотерапевтических доз НДЦ может определяться, как принято в токсикологии, введением к установленному порогу острого действия ситуационно обоснованного коэффициента запаса.

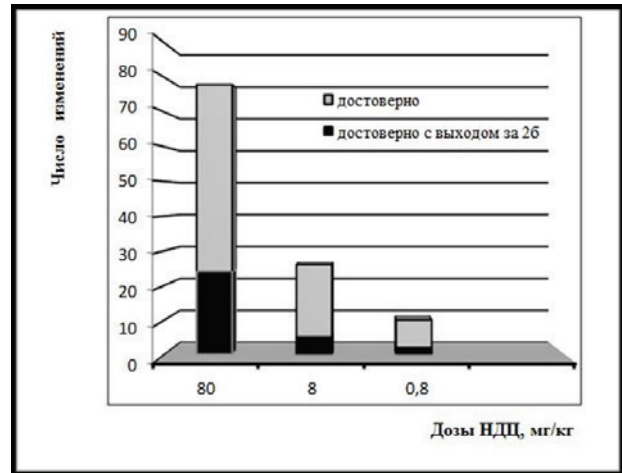


Рис 1. Сумма достоверных сдвигов в остром эксперименте

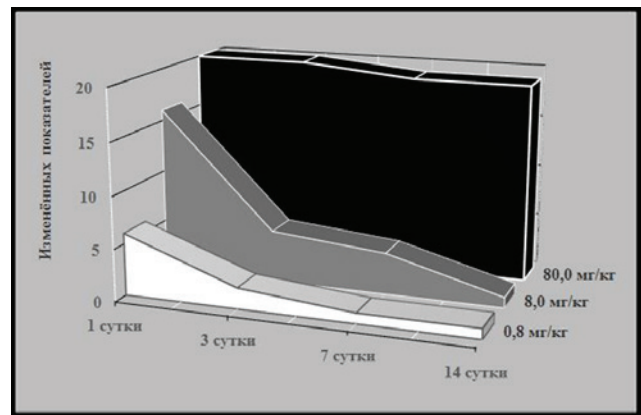


Рис 2. Динамика достоверных сдвигов на протяжении двух недель наблюдения

**Заключение.** Данные литературы последних лет убеждают, что дозозависимому характеру прооксидантной и антиоксидантной модальностям действия НДЦ начинает уделяться должное внимание [16]. Достаточную чёткость обрели представления о дозовых уровнях НЧ диоксида церия, вызывающих развитие окислительного стресса, и ценных, в первую очередь, для характеристики его токсикологического профиля [16-18]. Определилась и дистанцирована от них область доз, придающих НДЦ антиоксидантную активность, благодаря которой он и находит медико-биологическое применение в качестве средства защиты от окислительного стресса и формирующихся при его патогенетическом участии разнообразных заболеваний (нейродегенеративных, офтальмологических, эндокринных и др.) [8, 18-20]. Промежуточная между ними зона имеет достаточно размытые границы, в пределах которых реален риск нежелательной трансформации лечебного антиоксидантного действия НДЦ в повреждающее прооксидантное. Авторы публикации смеют надеяться, что выполненное ими исследование послужит уточнению этих границ.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сейфулла Р.Д., Рожкова Е.А., Ким Е.К. Антиоксиданты. Экспериментальная и клиническая фармакология. 2009; 72(3):60-64.
2. Сейфулла Р.Д. Наноантиоксиданты. Изво «Сам полиграфист», 2011. – 132 с.
3. З. Иванов В.К., Иванова О.С., Баранчиков А.Е., Третьяков Ю.Д. Нанооксидативный диоксид церия – компонент эффективных антиоксидантных препаратов. Available at: <http://www.igic.ras.ru/docs/patent/placat/ionh-3.pdf> (accessed 5 March 2019).
4. Попов А.Л. Исследование биологической активности цитрат-стабилизированных наночастиц диоксида церия (CeO<sub>2</sub>): дисс. ... канд. биол. наук: 03.01.02 / Попов А. Л.; [Место защиты: ФГБН Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук], 2017. – 144 с.
5. Puja Khanna, Cynthia Ong, Boon Huat Bay, Gyeong Hun Baeg. Nanotoxicity: An Interplay of Oxidative Stress, Inflammation and Cell Death: Review. *Nanomaterials*. 2015; 5:1163-1180; doi:10.3390/nano5031163.
6. Geetha N., Prabhavathi G., Ayeshamariam A., Beevi A.H., Punithavelan N., Uthiram C., Jayachandran M.. Review on a Nanomaterials Mechanisms-Induced Oxidative Stress and Toxicity: Review. *J Powder Metall. Min.* 2017; 6(3):185. doi:10.4172/2168-9806.1000185.
7. Zuberek M., Grzelak A. Nanoparticles-Caused Oxidative Imbalance. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2018; 1048: 691-698. doi: 10.1007/978-3-319-72041-8\_6.
8. Щербанов А.Б., Иванова О.С., Спивак Н.Я., Козик В.В., Иванов В.К. Синтез и биомедицинские применения нанодисперсного диоксида церия. – Томск, Издательский Дом Томского государственного университета. – 2016. – 474 с.
9. Jawahar Natarajan, Sukumar Nagavishwakya. Nanoceria: A Novel Cytoprotective Drug Delivery Carrier. *Current Nanomedicine*. 2017; 7(2): 111-116. DOI: 10.2174/2468187307666170208104644.
10. Syed Tawab Shah, Wageeh A. Yehye, Omar Saad, Khanom Simarani, Zaira Zaman Chowdhury, Abeer A. Alhadi, Lina A. Al-Ani. Surface Functionalization of Iron Oxide Nanoparticles with Gallic Acid as Potential Antioxidant and Antimicrobial Agents. *Nanomaterials (Basel)*. 2017 Oct; 7(10): 306. doi: 10.3390/nano7100306.
11. Sharpe E., Andreescu D., Andreescu S. Artificial Nanoparticle Antioxidants. *Oxidative Stress: Diagnostics, Prevention, and Therapy: Book. 2011; Chapter 8. – P. 235-253.*
12. Gagnon J., Fromm K.M. Toxicity and protective effects of cerium oxide nanoparticles (nanoceria) depending on their preparation method, particle size, cell type, and exposure route. *European Journal of Inorganic Chemistry*. 2015; (27):4510-4517.
13. Sanjay, S. Cerium oxide based nanozymes: Redox phenomenon at biointerfaces. *Biointerphases*. 2016; 11(4): 04B202.
14. Changyan Li, Xiangcheng Shi, Qiudi Shen, Chen Guo, Zepeng Hou, Jun Zhang. Hot Topics and Challenges of Regenerative Nanoceria in Application of Antioxidant Therapy: Review Article. *Journal of Nanomaterials*. Volume 2018. – Article ID 4857461, 12 pages.
15. Срослов М.С., Точилкина Л.П., Филатов Б.Н., Ходыкина Н.В. Экспериментальное изучение острой токсичности наночастиц диоксида церия. В сб.: *Нанотоксикология: достижения, проблемы и перспективы: Материалы научной конференции*. Волгоград, 2014; 58-9.
16. Ranjbar A., Ghasemi H., Kheiripour N. Cerium oxide nanoparticle modulates hepatic damage, inflammatory and oxidative stress biomarkers in a dose-dependent manner: an in vivo study of rat liver. *Nanomedicine Journal*. 2018; 5(4): 245-250.
17. Hardas S.S., Sultana S., Warriar G., Dan M., Florence R. L., Wu P., Grulke E.A., Tseng M.T., Unrine J.M., Graham U.M., Yokel R.A., Butterfield D.A. Rat brain pro-oxidant effects of peripherally administered 5 nm ceria 30 days after exposure. *NeuroToxicology*. 2012; 33:1147-1155.
18. Rzigalinski B. A., Carfagna C. S., Ehrich M. Cerium Oxide Nanoparticles in Neuroprotection and Considerations for Efficacy and Safety. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2017; 9(4): 10.1002/wnan.1444.
19. Hirst S.M., Karakoti A., Singh S., Self W., Tyler R., Seal S., Reilly C.M. Bio-distribution and in vivo antioxidant effects of cerium oxide nanoparticles in mice. *Environ Toxicol*. 2013; 28 (2): 107-118.
20. Nelson B. C., Johnson M. E., Walker M. L., Riley K. R., Sims Ch. M. Antioxidant Cerium Oxide Nanoparticles in Biology and Medicine: Review. *Antioxidants*. 2016; 5(15); doi:10.3390/antiox5020015.

## REFERENCES:

1. Seifulla R.D., Rozhkova E.A., Kim E.K. Antioxidants. *Experimental and clinical pharmacology*. 2009; 72(3):60-64 (in Russian).
2. Seifulla R.D. Nanoantioxidants, «Sam poligrafist», 20- 132 p. (in Russian).
3. Ivanov V.K., Ivanova O.S., Baranchikov A.E., Tretjakov Ju.D. Cerium Nanocrystalline Dioxide – Component of Effective Antioxidant Preparations. Available at: <http://www.igic.ras.ru/docs/patent/placat/ionh-3.pdf> (Accessed 5 March 2019) (in Russian).
4. Popov A.L. Investigation of the biological activity of citrate-stabilized cerium dioxide nanoparticles (CeO<sub>2</sub>): diss. kand. biol. science: 03.01.02 / Popov A. L.; [Place of defense: Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of the Russian Academy of Sciences, 20- 144 p. (in Russian).
5. Puja Khanna, Cynthia Ong, Boon Huat Bay, Gyeong Hun Baeg. Nanotoxicity: An Interplay of Oxidative Stress, Inflammation and Cell Death: Review. *Nanomaterials*. 2015; 5:1163-1180; doi: 10.3390/nano5031163.
6. Geetha N., Prabhavathi G., Ayeshamariam A., Beevi A.H., Punithavelan N., Uthiram C. et al. Review on a Nanomaterials Mechanisms-Induced Oxidative Stress and Toxicity: Review. *J Powder Metall. Min.* 2017; 6(3):1doi:10.4172/2168-9806.1000185.
7. Zuberek M., Grzelak A. Nanoparticles-Caused Oxidative Imbalance. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2018; 1048: 691-6doi: 10.1007/978-3-319-72041-8\_6.
8. Shherbakov A.B., Ivanova O.S., Spivak N.Ja., Kozik V.V., Ivanov V.K. Synthesis and biomedical applications of nano-dispersed cerium dioxide. – Tomsk, Publishing House of Tomsk State University. – 20- 474 p. (in Russian).
9. Jawahar Natarajan, Sukumar Nagavishwakya. Nanoceria: A Novel Cytoprotective Drug Delivery Carrier. *Current Nanomedicine*. 2017; 7(2): 111-116DOI: 10.2174/2468187307666170208104644.
10. Syed Tawab Shah, Wageeh A. Yehye, Omar Saad, Khanom Simarani, Zaira Zaman Chowdhury, Abeer A. et al. Surface Functionalization of Iron Oxide Nanoparticles with Gallic Acid as Potential Antioxidant and Antimicrobial Agents. *Nanomaterials (Basel)*. 2017 Oct; 7(10): 3doi: 10.3390/nano7100306.
11. Sharpe E., Andreescu D., Andreescu S. Artificial Nanoparticle Antioxidants. *Oxidative Stress: Diagnostics, Prevention, and Therapy: Book. 2011; Chapter – P. 235-253.*
12. Gagnon J., Fromm K.M. Toxicity and protective effects of cerium oxide nanoparticles (nanoceria) depending on their preparation method, particle size, cell type, and exposure route. *European Journal of Inorganic Chemistry*. 2015; (27):4510-4517.
13. Sanjay, S. Cerium oxide based nanozymes: Redox phenomenon at biointerfaces. *Biointerphases*. 2016; 11(4): 04B202.
14. Changyan Li, Xiangcheng Shi, Qiudi Shen, Chen Guo, Zepeng Hou, Jun Zhang. Hot Topics and Challenges of Regenerative Nanoceria in Application of Antioxidant Therapy: Review Article. *Journal of Nanomaterials*. Volume 20- Article ID 4857461, 12 p.
15. Sroslov M.S., Tochilkina L.P., Filatov B.N., Hodykina N.V. Experimental study of the acute toxicity of cerium dioxide nanoparticles. In: *Nanotoxicology: achievements, problems and prospects: Materials of the scientific conference*. Volgograd, 2014; 58-9 (in Russian).
16. Ranjbar A., Ghasemi H., Kheiripour N. Cerium oxide nanoparticle modulates hepatic damage, inflammatory and oxidative stress biomarkers in a dose-dependent manner: an in vivo study of rat liver. *Nanomedicine Journal*. 2018; 5(4): 245-250.
17. Hardas S.S., Sultana S., Warriar G., Dan M., Florence R. L., Wu P. et al. Rat brain pro-oxidant effects of peripherally administered 5 nm ceria 30 days after exposure. *NeuroToxicology*. 2012; 33:1147-1155.
18. Rzigalinski B. A., Carfagna C. S., Ehrich M. Cerium Oxide Nanoparticles in Neuroprotection and Considerations for Efficacy and Safety. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2017; 9(4): 10.1002/wnan.1444.
19. Hirst S.M., Karakoti A., Singh S., Self W., Tyler R., Seal S. et al. Bio-distribution and in vivo antioxidant effects of cerium oxide nanoparticles in mice. *Environ Toxicol*. 2013; 28 (2): 107-118.
20. Nelson B. C., Johnson M. E., Walker M. L., Riley K. R., Sims Ch. M. Antioxidant Cerium Oxide Nanoparticles in Biology and Medicine: Review. *Antioxidants*. 2016; 5(15); doi:10.3390/antiox5020015.

N.V. Khodykina, L.P. Tochilkina, O.N. Novikova, M.S. Sroslov, A.Ya. Pocheptsov, Yu.I. Velikorodnaya

## ACUTE TOXICITY OF CERIUM DIOXIDE NANOPARTICLES

Research Institute for Hygiene, Toxicology and Occupational Pathology, Federal Medical and Biological Agency, 400048, Volgograd, Russian Federation

The resorptive effects of 0.01 M cerium nanodioxide sol upon single intraperitoneal administration to rats have been studied. The acute exposure to cerium nanoparticles was found to have a dose-dependent general toxic effect on the body (weight loss, inflammatory changes in the abdominal organs, modification of individual behavior, hematological changes, metabolic imbalance), which develops on the background of POL activation. The prooxidant effect of cerium dioxide nanoparticles is demonstratively manifested at relatively high exposure levels (80–8 mg / kg). The threshold dose for the general toxic effect ( $Lim_{ch}^{integr}$ ) is equal to 0.8 mg / kg.

**Keywords:** cerium dioxide nano, rats, acute toxicity, prooxidant action, antioxidant action.

Материал поступил в редакцию 23.04.2019 г.

## ЮБИЛЕЙНЫЕ ДАТЫ

# К 90-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ ЧЛЕН-КОРРЕСПОНДЕНТА РАН Б.А. КУРЛЯНДСКОГО (02.06.1929 – 17.06.2018 гг.)

17 июня 2018 г. на 90-м году жизни скончался видный советский-российский ученый-токсиколог и организатору здравоохранения, член-корреспондент РАН, профессор, доктор медицинских наук Борис Аронович Курляндский.

Трудовую деятельность Б.А. Курляндский начал в феврале 1943 г. в должности электрика на оборонном предприятии № 691 в г. Москве. В июне 1944 г. принимал участие в борьбе с бандитизмом. После продолжения учёбы и окончания в 1953 г. санитарно-гигиенического факультета 1 Московского ордена Ленина медицинского института работал в должности главного врача (начальника) СЭС-2, а затем ДорСЭС Карагандинской ж.д. в г. Акмолинске (Казахская ССР), активно участвуя в санитарно-эпидемиологическом обеспечении первых лет освоения целинных и залежных земель Казахстана. С 1957 по 1960 гг. проходил аспирантуру при кафедре промышленной гигиены ЦИУ(В), по окончании которой работал до 1962 г. младшим научным сотрудником НИИ гигиены детей и подростков АМН СССР, затем перешел на работу в санитарную службу г. Москвы, возглавив создание и работу первой в системе государственного санитарного надзора токсикологической лаборатории МосгорСЭС, ставшей в дальнейшем инициатором и примером создания аналогичных лабораторий в системе Госсанэпиднадзора.

В 1978 г. был избран заведующим, созданной при его участии, лабораторией 7-3 (гигиены и токсикологии) МНПО «НИОПИК», где проработал 14 лет, а с 1992 г. и по 02 июня 2009 г. был директором ФБУЗ «Российский регистр потенциально опасных химических и биологических веществ» Роспотребнадзора, возглавив, впервые в России, разработку методологии и осуществление в госсанэпиднадзоре России государственной регистрации потенциально опасных химических и биологических веществ.



Кандидатскую диссертацию Б.А. Курляндский защитил в 1962 г., докторскую в 1971 г. В 1987 г. ему присвоено ученое звание профессора, в 2004 г. был избран членом-корреспондентом РАМН по специальности «санитарная токсикология», ныне РАН.

Наряду с активной организаторской деятельностью Б.А. Курляндским внесен большой вклад в развитие отечественной токсикологии. Основные исследования Б.А. Курляндского посвящены теоретическим и прикладным проблемам общей и про-

филактической токсикологии. Круг научных интересов Б.А. Курляндского был широк и разнообразен. Им детально разработана концепция смены фаз реактивности организма при длительном воздействии химических веществ. Впервые разработана экспериментальная модель индуцирования злокачественных новообразований на фоне изменённой реактивности организма, показана зависимость скорости и частоты возникновения злокачественных новообразований различной природы, индуцированных в различные фазы предшествующей интоксикации. Под руководством и при участии Б.А. Курляндского проведены исследования влияния токсикантов на энергетические процессы в клетке и использования этих реакций для регламентирования токсикантов, проведено изучение действия веществ на обмен нуклеиновых кислот, катехоламинов, выявлена зависимость токсических свойств гетероциклических углеводов от их изомерии. Б.А. Курляндскому принадлежат фундаментальные и прикладные исследования по токсикологии органических красителей и полупродуктов, электроно и фоторезистов, что позволило впервые в гигиенической практике перейти от их индивидуального к групповому регламентированию, основанному на общности механизмов токсического действия и патогенеза интоксикации. Под руководством и при участии Б.А. Курляндского

выполнен ряд исследований, позволивших на основе корреляционного анализа разработать подходы к оптимизации регламентирования токсикантов в окружающей среде.

Большое место в исследованиях Б.А. Курляндского было уделено изучению канцерогенных свойств веществ и количественной оценке канцерогенной опасности в том числе таких соединений, как бензидин, дианзидин, винилхлорид и др. Им впервые была разработана количественная классификация опасности химических канцерогенов и предложена оригинальная методика их гигиенического регламентирования. Он являлся долгое время членом Комиссии по канцерогенным веществам Роспотребнадзора.

Под руководством и при участии Б.А. Курляндского была разработана и внедрена в химической промышленности отраслевая информационно-поисковая система «Токсикология АКП», отмеченная в 1987 г. Золотой медалью ВДНХ СССР.

С 1992 г. основные исследования Б.А. Курляндского направлены на научное обоснование и создание в России системы Государственной регистрации потенциально опасных химических и биологических веществ. Под его руководством и при участии был создан первый официальный информационный ресурс – Федеральный регистр потенциально опасных химических и биологических веществ Роспотребнадзора, обеспечивающий информацией об опасных веществах органы здравоохранения, Роспотребнадзора и другие заинтересованные организации. Проведенные исследования позволили впервые провести обобщенный прогноз потенциальной опасности химических веществ на территории России в зависимости от их производства и обращения.

Б.А. Курляндский автор 462 работ, в том числе 3 монографий, фундаментального руководства «Общая токсикология», учебника, 2-х многотомных справочников, авторского свидетельства.

Под руководством и при консультативном участии Б.А. Курляндского выполнено и защищено 13 кандидатских и 4 докторских диссертации. В течении 12 лет он состоял членом Экспертного совета ВАК РФ.

Им создана научная школа, отличительной особенностью которой является сочетание глубоких теоретических исследований с практической направленностью.

Б.А. Курляндский являлся инициатором создания в 1993 г. и бессменным главным редактором журнала «Токсикологический вестник». Многие годы он возглавлял правление Всероссийской общественной организации токсикологов (Российское токсикологическое общество).

Значительное место в работе Б.А. Курляндского занимала международная деятельность. На протяжении 15 лет он представлял Российскую Федерацию на заседаниях Межправительственных переговорных комитетов по созданию Стокгольмской и Роттердамской конвенций. С 1998 г. являлся членом Постоянного комитета, а с 2002 г. по 2005 г. был избранным вице-президентом V Межправительственного форума по химической безопасности от региона стран Центральной и Восточной Европы. В течение 5 лет Б.А. Курляндский являлся членом Комитета по химическим веществам Роттердамской конвенции. Трижды он возглавлял делегацию Российской Федерации на заседаниях Комитета ЮНЕП-ФА-О-ВОЗ по разработке международной стратегии химической безопасности.

Б.А. Курляндский был ветераном ВОВ, ветераном труда, награжден орденом СССР «Знак почета» и «Орденом дружбы» России, медалью «За доблестный труд в Великой Отечественной войне», а также шестью медалями СССР и России, значком «Отличнику здравоохранения», памятной медалью «90 лет госсанэпидслужбы России», серебряной медалью РАЕН. Отмечен золотой медалью ВДНХ СССР.

***Коллектив ФБУЗ «Российский регистр потенциально опасных химических и биологических веществ» Роспотребнадзора, редакция и редколлегия журнала «Токсикологический вестник», Правление «Всероссийской общественной организации токсикологов», друзья и коллеги.***

Светлая память!

