

Особенности биологического действия фенантрена в хроническом токсикологическом эксперименте

В хроническом эксперименте изучены особенности биологического действия фенантрена, установлена пороговая доза на уровне 1 мг/кг, максимально недействующая (подпороговая доза) на уровне - 0,1 мг/кг. Введение фенантрена в дозе не токсичной для материнского организма вызывает сильное эмбриотропное действие. Обоснована допустимая суточная доза фенантрена – 0,0002 мг/кг/сутки.

Ключевые слова: Полиароматический углеводород фенантрен, белые крысы, хроническая токсичность, эмбриотоксичность, пороговая доза в хроническом эксперименте.

Целью исследования являлось изучение особенностей биологического действия полиароматического углеводорода (ПАУ) фенантрена в хроническом эксперименте, исследование репродуктивной токсичности*.

* - исследования выполнены сотрудниками лабораторий общей токсикологии и лаборатории гигиены труда в аллергоопасных производствах ГУ «Республиканский научно-практический центр»

Объекты и методы

В хроническом 12-месячном эксперименте использованы половозрелые рандомбрендные белые крысы массой 180-200 г, которые были разделены на опытные и 0,1, 1,0 и 10,0 мг/кг массы тела. В связи с тем, что фенантрен не растворим в воде, рабочие растворы готовили на 0,05 % твине – 80, что определило необходимость ввести дополнительную контрольную группу экспериментальных животных и выяснить возможное действие растворителя на организм животного. Второй контрольной группе животных вводили воду в объеме 0,5 мл на 100 г массы тела. Основной путь биотрансформации ПАУ /1/ является система микросомальных ферментов печени, а также механизмы реакций, катализируемых системой цитохром-Р-450-зависимых монооксигеназ. Особое место в детоксикации ПАУ занимает образование конъюгатов с глутатионом. Этот ферментативный процесс катализируется цитоплазматическим ферментом глутатион-S-трансферазой и играет основную роль в обезвреживании активных метаболитов ПАУ, при условии, что конъюгирование происходит в момент их образования. На основании литературных данных нами был выбран комплекс диагностически важных ферментов и метаболитов, которые участвуют в процессах детоксикации и имеют различную внутриклеточную локализацию: лактатдегидрогеназа - цитоплазматическую; сукцинатдегидрогеназа - митохондриальную, аминопиридиндеметилаза и анилингидроксилаза, обеспечивающие процессы конъюгации – микросомальную. Остальные метаболиты характеризуют степень защиты гепатоцитов и процессы детоксикации при хроническом воздействии фенантрена. SH-группы своей высокой реакционной способностью и большим многообразием биохимических реакций в которые они вступают (процессы ацилирования, алкилирования, окисления, фосфорилирования и др.),

обуславливая их исключительное значение в образовании сложных трехмерных структур белков. Эти процессы напрямую связаны с ферментативным катализом, проницаемостью мембран, и в конечном счете функцией субклеточных структур и целостной клетки. Есть мнение, что SH-группы несут важную функциональную нагрузку по защите каталитических центров энзимов. Динамику развития окислительного стресса, который лежит в основе многих патологических процессов, инициируемых ксенобиотиками, оценивали по накоплению малонового диальдегида (МДА), карбонильных производных белков (КПБ) - по концентрации битирозина и флуоресценции остатков триптофана. Значимое место в защите мембран занимают антиоксидантные механизмы энзимной природы, которые характеризуют супероксиддисмутаза и глутатионтрансфераза. Общий уровень неспецифической резистентности организма рандомбрендных белых крыс оценивали по состоянию микрофлоры кожи носа и хвоста. Среди гуморальных тестов неспецифической резистентности использовали адекватные для животных показатели – комплементарную и бактерицидную активность сыворотки крови (БАСК), определение активности в ней лизоцима. О возможности появления иммунокомплексных и аутоиммунных реакций судили по накоплению в крови циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК). /8/

Результаты и обсуждение.

Полученные результаты показали, что твин - 80 (в дозе 0,25 мг/кг) не влияет на изученные метаболические биохимические /3, 4, 5, 9/, морфологические, иммунологические и физиологические показатели белых крыс.

Хроническое внутрижелудочное введение фенантрена в дозе 10 мг/кг привело к увеличению коэффициента массы почек на 7,5% по отношению к чистому контролю и контролю твина. Суммационно-пороговый показатель при воздействии фенантрена в дозах 1,0 мг/кг, 10,0 мг/кг имел тенденцию к снижению, однако достоверные изменения не отмечены. Препарат не влиял на показатели морфологического состава периферической крови. Установлено снижение диуреза в опытных группах в сравнении с контролями (таблица 1).

Таблица 1

Показатели состояния выделительной системы белых крыс при хроническом поступлении фенантрена

Показатель	Сроки наблюдения	Результаты исследований				
		контроль вода	контроль твин-80	фенантрен 0,1 мг/кг	Фенантрен 1,0мг/кг	фенантрен 10,0 мг/кг
Диурез, мл/сут	Исх.	8,8+ 0,99		8,6+ 1,56	9,2+0,921	8,6+ 0,64
	12 мес.	6,2+0,50	5,6+0,50	5,1+0,67	5,2+0,89	9,4+0,73*
рН мочи	Исх.	7,2+0,14		7,05+0,85	6,9+1,56	6,9+1,33
	12 мес.	6,8+0,31	7,1+ 0,09	7,1+0,35	7,2+0,35	7,6+0,22
Белок, г/л	Исх.	0,33+0,07		0,5+1,02	0,6+0,15	0,4+ 0,07
	12 мес.	0,5+0,05	0,6+0,1	0,6+0,15	0,5+0,1	0,6+0,15
Мочевина, ммоль/л	Исх.	125,5+12,3		137,5+10,47	123,3+0,15	137,7+10,60
	12 мес.	144,6+13,8	128,4+6,32	136,4+11,25	135,5+17,09	144,1+10,17
Хлориды, ммоль/л	Исх.	37,6+5,75		31,7+3,85	36,9+2,55	32,4+4,86
	12 мес.	46,1+2,51	50,1+7,11	45,9+7,28	50,3+3,82	50,1+5,04

Примечание: здесь и далее *- статистически достоверно по отношению к чистому контролю

В сыворотке крови воздействие фенантрена в дозах 0,1 мг/кг и 1,0 мг/кг не приводит к изменению содержания АсАТ, АлАТ и лактатдегидрогеназы (ЛДГ). В тоже время, максимальная доза фенантрена (10,0 мг/кг) вызывает достоверное возрастание концентрации трансаминаз и ЛДГ в сыворотке крови.

Таблица 2

Биохимические показатели сыворотки крови белых крыс при хроническом поступлении фенантрена

Показатель	Результаты исследований				
	контроль вода	контроль гвин-80	Фенантрен 0,1 мг/кг	фенантрен 1,0 мг/кг	фенантрен 10,0 мг/кг
Белок (г/л)	83,7±2,55	82,7±4,31	76,8±4,92	83,0±5,41	80,3±4,51
Мочевина (ммоль/л)	6,0±0,84	6,3±0,65	6,5±0,54	6,0±0,56	7,2±0,65
Хлориды (ммоль/л)	90,3±4,62	94,7±3,50	95,2±4,46	94,7±3,50	96,2±3,95
Глюкоза (ммоль/л)	5,0±0,29	5,8±0,74	5,2±0,44	5,8±0,73	5,2±0,47
Креатинин (мкмоль/л)	67,9±5,89	59,3±3,37	61,9±5,22	61,2±5,28	53,8±5,16
Аминопириндемителаза в микросомальной фракции печени (мк кат. форм/кг белка)	14,9±0,70	16,0±0,40	16,8±0,95	17,3±1,13	18,2±1,50*
Анилингидроксилаза в микросомальной фракции печени (нМ минопирина на кг белка)	4,9±0,31	5,4±0,38	5,7±0,32	6,0±0,47	6,8±0,47*
Сукцинатдегидрогеназа в гомогенате печени (мкк формазана на кг белка)	18,0±0,55	19,2±0,35	17,0±0,99	16,4±0,74	16,0±0,90
Лактатдегидрогеназа в сыворотке крови (НАД(ФН) на кг/белка)	35,0±2,88	40,5±1,77	40,3±2,60	40,7±2,87	48,7±4,10*
Супероксиддисмутаза в гомогенате печени (мкг/мл)	197,3±11,52	192,0±10,24	203,9±14,53	196,0±12,0	204,7±14,52
SH-группы в цитозольной фракции печени (мкМ SH/г ткани)	9,19±1,84	8,72±2,00	7,28±0,51	8,0±0,95	5,73±0,43*
SH-группы в гемолизатах крови (мкМ SH/мл крови)	73,27±3,87	74,06±4,71	75,6±2,76	79,8±3,33	71,4±4,72
Триптофан (усл. единицы)	49,7±3,80	47,6±1,66	53,4±5,44	43,4±2,17	46,32±1,53
Малоновый диальдегид (нмоль/мл)	5,5 ±1,31	5,08 ± 1,38	6,14 ±1,77	6,6±1,00	6,8± 1,26
Битропин (усл. единицы)	22,4±1,80	29,4±2,84	21,41±0,25	21,3±1,18	25,6± 1,73

При оценке действия фенантрена на микросомальное окисление, которое определялось по активности аминопириндемителазы и анилингидроксилазы гомогенатов печени, показано, что достоверные увеличения активности этих монооксигеназ происходят при введении фенантрена в дозе 10,0 мг/кг.

Результаты исследований свидетельствуют о достоверном снижении уровня SH-групп в гомогенате печени при воздействии фенантрена в дозе 10,0 мг/кг. В то же время ферментативные и неферментативные антиоксидантные системы, отражающие уровень свободно-радикальных процессов, не претерпевают

статистически значимых различий по сравнению с контрольными данными. Также, не обнаружено достоверных изменений в содержании продуктов перекисного окисления липидов и белков (производные триптофана и битириозин). Содержание белка на всем протяжении эксперимента практически не изменялось. Это свидетельствует о поддержании коллоидно-осмотического давления в нормальных пределах, тем самым обеспечивается постоянный объем крови. То есть, связывая и задерживая воду, белок не позволяет выходить ей за пределы кровяного русла, при этом он является одним из основных компонентов гомеостаза клетки.

Сравнивая показатели содержания мочевины и остаточного небелкового азота (креатинина) в сыворотке крови не выявлено значимых отклонений от контрольных величин, что говорит об отсутствии циркуляторной недостаточности в клубочковой зоне почек и нарушении работы почечного фильтра.

В процессе воздействия фенантрена уровень хлоридов не изменяется, таким образом, осмотическое, кислотно-щелочное равновесие и баланс воды в организме остается постоянным.

С достоверностью можно констатировать отсутствие сдвигов в содержании глюкозы в исследуемом материале.

Патоморфологическое исследование внутренних органов крыс, получавших фенантрен в дозе 0,1 мг/кг (печень, почки, сердце, селезенка, надпочечники, щитовидная железа) не выявило различий с контролем. Патоморфологические изменения, обнаруженные при воздействии токсиканта в дозах 1,0 мг/кг и 10,0 мг/кг свидетельствуют о развитии в почках и печени умеренно выраженных изменений адаптационного характера.

Хроническое внутрижелудочное введение белым крысам фенантрена в дозах 1,0 и 10,0 мг/кг приводит к дозозависимому снижению неспецифической резистентности в отношении защитных свойств слизистых оболочек кожи носа и кожи хвоста белых крыс, о чем свидетельствует увеличение общей микробной, стафилококковой и энтеробактериальной обсемененности кожи подопытных животных. Доза препарата 0,1 мг/кг не влияет на исследованные показатели. Внутрижелудочное введение фенантрена в дозе 1,0 мг/кг оказывает влияние на гуморальные факторы системы иммунитета белых крыс - выразившееся к достоверному снижению циркулирующих иммунных комплексов.

Анализируя результаты, полученные в хроническом токсикологическом эксперименте можно сделать вывод, что доза фенантрена – 1 мг/кг является пороговой, доза – 0,1 мг/кг максимально недействующей (подпороговой) дозой.

Введение фенантрена в разные сроки беременности в токсической дозе (2500 мг/кг) вызывает многочисленные нарушения показателей эмбрионального развития – уменьшается среднее количество родившихся плодов, увеличивается среднее количество желтых тел на одну самку и средняя масса плаценты, уменьшается средняя масса и длина плода. Введение фенантрена в течение всей беременности в пороговой и недействующей дозах, установленных в хроническом эксперименте (соответственно 1,0 мг/кг и 0,1 мг/кг) вызвало при действии дозы 0,1 мг/кг уменьшение среднего количества родившихся плодов и среднего количества желтых тел на одну самку, снижение длины плода и средней массы плаценты. Введение препарата в дозе 1,0 мг/кг привело к уменьшению

среднего количества родившихся плодов, увеличению среднего количества желтых тел на одну самку, увеличению средней массы и длины плода и средней массы плаценты./ 2, 6, 7/

Полученные результаты свидетельствуют о сильном эмбриотоксическом действии фенантрена в дозах, не токсичных для материнского организма.

Учитывая сильное эмбриотоксическое действие фенантрена при расчете допустимой суточной дозы (ДСД) введен коэффициент запаса 500. Обоснована ДСД фенантрена 0,0002 мг/кг/сутки.

Литература

1. Вредные химические вещества. Углеводороды. Галогенпроизводные углеводородов: Справ. Изд./А.Л. Бадман. Г.А. Войтенко, Н.В. Волкова. Под ред. В.А. Филова и др. – Л.: Химия, 1990. –732.
2. А.А. Динерман Роль загрязнителей окружающей среды в нарушении эмбрионального развития. / «Медицина» Москва 1980. – 192.
3. Карузина А.И., Арчакова А.И. Современные методы в биохимии. - М.: Медицина, 1977. - С. 46-69.
4. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике химии. - Минск: Беларусь, 1982.-366.
5. Кочетов Г. А. Практическое руководство по энзимологии. - М.: Высшая школа, 1971.
6. Методические указания № 1744 – 77 «Методы экспериментального исследования по установлению порогов действия промышленных ядов на генеративную функцию с целью гигиенического нормирования» - Москва - 1978
7. Методические указания по изучению гонадотоксического действия веществ при гигиеническом нормировании в воде водоемов» № 2492 – 81 – Москва – 1981.
8. Ремизов П.И. Методы определения естественной (неспецифической) резистентности организма: Учеб. пособие ВМА им. С.М. Кирова / П.И. Ремизов, Г.А. Башмаков.- Л., 1976.- 64 с.
9. Sedlak J., Lindsay R.H. Anal. Biochem. - 1968. - Vol. 25. - № 1. - P. 192-205.