

ТОКСИКОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ГЕКСИЛОВОГО ЭФИРА 5-АМИНОЛЕВУЛИНОВОЙ КИСЛОТЫ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ПУТЯХ И РЕЖИМАХ ОДНОКРАТНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ

Е.К. Власенко, С.И. Сычик, В.А. Стельмах, В.А. Грынчак

*Республиканское унитарное предприятие «Научно-практический центр гигиены»,
Минск, Беларусь*

Введение

Гексиловый эфир 5-аминолевулиновой кислоты (ГЭ-АЛК) признан перспективным для экологического растениеводства регулятором роста сельскохозяйственных растений [1]. В целях обоснования и проведения мероприятий, направленных на защиту здоровья человека и среды его обитания еще на стадии проектирования/разработки химической продукции и/или процессов ее производства [2], а также в соответствии с требованиями межнационального законодательства [3] на первом этапе развернутых токсиколого-гигиенических исследований необходимо выявить закономерности проявления токсических свойств ГЭ-АЛК в острых экспериментах в условиях его ингаляционного и эпикутанного воздействия, оценить влияние на слизистые оболочки и орган зрения лабораторных животных, выполнить тесты на аллергобезопасность. Результаты проведенных экспериментов отражены в настоящем сообщении.

Методы исследования

В экспериментальной работе использовали синтезированный в Институте биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси ГЭ-АЛК гидрохлорид, представляющий собой белый кристаллический порошок со слабым характерным запахом, хорошо растворимый в воде.

Эксперименты выполнены на 60 нелинейных белых мышах обоего пола массой тела 17–23 г, 21 рандомбредной белой крысе, массой тела 180–210 г и на 3 кроликах породы Шиншилла, массой 4,2–4,5 кг. Обращение с животными соответствовало этическим принципам надлежащей лабораторной практики [4].

Определение степени опасности отравления при трансдермальном пути поступления проведено на 7 беспородных белых крысах-самцах, массой 180–200 г, путем однократного нанесения 320 мкл 50%-ого водного раствора ГЭ-АЛК на предварительно выстриженные участки кожи спины площадью 20 см². В качестве контроля использовали аналогичную группу животных, которым на спину наносили растворитель – дистиллированную воду. После аппликаций животных фиксировали на 4 часа. Наблюдение за состоянием крыс проводили в течение 14 суток с регистрацией развития симптомов интоксикации [5].

По окончании эксперимента крыс взвешивали и после мгновенной декапитации определяли коэффициенты массы органов, макроскопически оценивали изменения состояния ряда внутренних органов.

Токсичность ГЭ-АЛК при ингаляционном воздействии изучали на белых мышах обоего пола (10 самцов и 10 самок, массой 17–23 г) в затравочной камере объемом 250 дм³. Препарат предварительно растворяли в дистиллированной воде. Для измерения концентрации вещества в камере с помощью аспиратора отбирали пробы воздуха. Длительность ингаляционной затравки составляла 2 часа, после чего за состоянием подопытных животных наблюдали еще в течение 14 суток. В качестве контроля использовали аналогичную схему опыта с применением растворителя – дистиллированной воды [5]. По окончании эксперимента определяли массу тела подопытных мышей.

Изучение местно-раздражающих свойств проведено на 7 самцах белых беспородных крыс путем однократного нанесения 320 мкл 50%-ого водного раствора ГЭ-АЛК на

предварительно выстриженные участки (с правой стороны) кожи 4x4 см (0,02 мл/см²). Время экспозиции – 4 часа. Контролем служил противоположный участок кожи спины (с левой стороны) того же животного. По окончании аппликаций остатки вещества удаляли теплой водой.

Период наблюдений за клиническими проявлениями интоксикации и состоянием кожных покровов, включая инструментальные исследования, проводили через 1 и 16 часов после аппликации и смыва остатков вещества. Выраженность эритемы оценивали визуально в баллах: отсутствие – 0, слабая – 1, умеренно выраженная – 2, выраженная – 3, резко выраженная – 4. Величину отека кожи определяли путем измерения толщины кожной складки микрометром (в мм), его интенсивность по сравнению с фоновым значением оценивали по шкале от 0 до 4 баллов [5].

Исследование особенностей раздражающего действия ГЭ-АЛК на слизистые оболочки глаз проводили на кроликах, самцах, массой 4,2–4,5 кг. В опытные группы отобраны животные, не имеющие повреждений роговой оболочки, дефектов слизистых оболочек и явлений раздражения глаз. ГЭ-АЛК в количестве 50 мкл 50%-ого водного раствора вносили в нижний конъюнктивальный свод правого глаза кролика, левый глаз (50 мкл дистиллированной воды) служил контролем.

Визуальное наблюдение за состоянием слизистых оболочек глаз кроликов после внесения исследуемого соединения проводили в течение 14 суток. Регистрировали проявление признаков раздражения слизистых оболочек глаз – гиперемии конъюнктивы и роговицы, отека век, выделений из глаза [5].

Оценку сенсибилизирующих свойств выполняли с помощью модели воспроизведения гиперчувствительности замедленного типа. Эксперимент проведен на белых беспородных мышках-самцах (17–23 г), из которых сформировано две группы (по 10 особей в опытной и контрольной группах). ГЭ-АЛК растворяли в физиологическом растворе – рабочая концентрация раствора составляет 0,33%. Из раствора вещества в рабочей концентрации в соотношении 1:1 готовили смесь с иммуностимулятором – полным адьювантом Фрейнда (ПАФ). Опытным животным внутрикожно в основание хвоста вводили сенсибилизирующую дозу ГЭ-АЛК в количестве 60 мкл; контрольным – 60 мкл смеси ПАФ с физиологическим раствором (соотношение 1:1). На 6-е сутки опыта вводили разрешающую дозу ГЭ-АЛК, растворенного в физиологическом растворе, в количестве 120 мкл в подушечку задней лапы белых мышей (под апоневроз). О величине отека судили по разнице в толщине лапы, измеряемой до и через 24 часа после перкутанного тестирования [5].

Результаты исследований обрабатывали общепринятыми методами вариационной статистики [6]. При оценке различий между группами использовали параметрический t-критерий Стьюдента с учетом поправки Бонферрони или непараметрический U-критерий Манна-Уитни. Количественные параметры представлены в виде среднего значения (M) и 95% доверительного интервала ($\pm 95\%$ ДИ), либо в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха [25%;75%]. Критическим уровнем значимости при проверке статистических гипотез был принят $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

При изучении токсических свойств ГЭ-АЛК при эпикутанном поступлении в период наблюдения после однократного воздействия не зарегистрировано проявлений интоксикации и гибели животных в контрольной и опытной группах.

Подопытные животные были подвижны, у них сохранялся нормальный уровень спонтанной двигательной активности. Крысы охотно потребляли корм и воду, у них не регистрировались изменение скорости и глубины дыхания, а также цвета кожи и видимых слизистых оболочек. Также не наблюдались клинические проявления отравления со стороны желудочно-кишечного тракта, диуреза, мышечного тонуса.

В пересчете на массу тела подопытных животных экспозиционная доза ГЭ-АЛК составила 800 мг/кг, что является максимально возможной величиной для условий данного

эксперимента. Следовательно, средняя смертельная доза при однократном нанесении на кожу животных превышает значения, принятые в качестве классификационных при отнесении веществ к 3 классу – веществам умеренно опасным.

К окончанию эксперимента подопытных животных взвешивали и изучали динамику изменения массы тела (таблица 1). Белые крысы, подвергнутые однократному эпикутанному воздействию ГЭ-АЛК демонстрировали прирост массы тела на уровне 129% от контрольного значения, однако отличия не являются статистически значимыми.

Таблица 1 – Динамика изменения массы крыс белых крыс, подвергнутых однократному эпикутанному воздействию ГЭ-АЛК, кг⁻¹, M(±95%ДИ)

Группы сравнения	Масса тела животных, кг ⁻¹		Прирост массы тела	
	До начала эксперимента	На 14-е сутки эксперимента	за время эксперимента, кг ⁻¹	по сравнению с контролем, %
контрольная	186 (178–193)	203 (192–214)	17,1 (9,6–24,6)	100
опытная	191 (183–199)	213 (201–224)	22,1 (9,6–34,6)	129

Макроскопически при вскрытии контрольных и подопытных крыс, подвергнутых однократному эпикутанному воздействию ГЭ-АЛК, не выявлено существенных признаков токсического влияния препарата, состояние внутренних органов у подопытных и контрольных крыс, а также величины ОКМ ряда их органов не имели существенных различий (таблица 2).

Таблица 2 – Относительные коэффициенты массы внутренних органов крыс, подвергнутых однократному эпикутанному воздействию ГЭ-АЛК, г/кг⁻³, M(±95%ДИ)

Органы	Группы сравнения	
	контрольная	опытная
Печень	34,4 (31,6–37,2)	36,5 (33,5–39,4)
Почки	7,0 (6,6–7,4)	6,6 (6,1–7,0)
Надпочечники	0,17 (0,15–0,19)	0,16 (0,15–0,17)
Селезенка	4,6 (3,7–5,4)	4,6 (3,7–5,5)
Сердце	3,7 (3,5–4,0)	3,5 (3,2–3,9)

Во время проведения ингаляционной затравки (максимально достижимая концентрация мелкодисперстного аэрозоля препарата составила 72,2 мг/м³) и в последующие 14 суток наблюдения после воздействия ГЭ-АЛК гибель животных и признаки интоксикации в опытных и контрольных группах отсутствовали. Мыши были подвижны, у них сохранялся нормальный уровень спонтанной двигательной активности. Животные охотно потребляли корм и воду, у них не регистрировались изменение скорости и глубины дыхания, а также цвета кожи и видимых слизистых оболочек.

К окончанию эксперимента прирост массы тела животных, подвергнутых однократному ингаляционному воздействию ГЭ-АЛК не имел достоверных отличий по сравнению с контролем (таблица 3).

Следовательно, в аgravированных условиях моделирования острого ингаляционного отравления достигнута максимально возможная концентрация водного аэрозоля ГЭ-АЛК, равная 72,2 мг/м³. При этом, гибели подопытных белых мышей и проявлений интоксикации не зарегистрировано. Исходя из физических свойств, ГЭ-АЛК способен загрязнять воздушную среду только в виде аэрозоля дезинтеграции. В соответствии с методическими указаниями [7], исследовавшийся уровень воздействия препарата не может быть использован

в качестве квалификационного гигиенического критерия для установления класса опасности ГЭ-АЛК при ингаляционном пути поступления.

Таблица 3 – Динамика изменения массы крыс белых мышей, подвергнутых однократному ингаляционному воздействию ГЭ-АЛК, кг⁻¹, M(±95%ДИ)

Группы сравнения	Масса тела животных, кг ⁻¹		Прирост массы тела за время эксперимента, кг ⁻¹
	До начала эксперимента	На 14-е сутки эксперимента	
Самцы контроль	19,2 (17,9–20,4)	24,7 (23,0–26,3)	5,5 (4,7–6,3)
Самцы опыт	19,0 (17,5–20,5)	23,4 (22,1–24,6)	4,4 (3,3–5,5)
Самки контроль	19,3 (18,1–20,5)	24,2 (22,2–26,1)	4,9 (3,2–6,6)
Самки опыт	19,3 (18,4–20,2)	23,9 (22,4–25,4)	4,6 (3,3–5,9)

При изучении местно-раздражающего действия ГЭ-АЛК не выявлены признаки гиперемии и визуально значимые изменения статуса кожных покровов подопытных животных. Участки кожи в местах аппликаций были аналогичны контрольным, не имели уплотнений, шелушений и инородных образований. При эпикутанном воздействии ГЭ-АЛК визуально на коже опытных и контрольных животных в течение всего периода наблюдения эритематозных проявлений не зарегистрировано (0 баллов при оценке степени выраженности эритемы), не зафиксировано также нарастания инструментально измеряемой толщины кожной складки животных по сравнению с фоном (градация интенсивности – отсутствие реакции, оценка отека в баллах – 0 баллов) (таблица 4).

Таблица 4 – Толщина кожной складки белых крыс, подвергнутых эпикутанному воздействию ГЭ-АЛК, мм, M(±95%ДИ)

Величина толщины кожной складки, мм	Группы сравнения	
	контроль	опыт
До начала эксперимента	1,5 (1,3–1,6)	1,5 (1,4–1,6)
Через 1 час после воздействия	1,6 (1,4–1,8)	1,5 (1,3–1,6)
Через 16 часов после воздействия	1,6 (1,5–1,7)	1,6 (1,4–1,7)

Таким образом, суммарная количественная оценка степени индукции эритемы и отека для контроля и опыта при воздействии ГЭ-АЛК составляет по 0 баллов.

Следовательно, в условиях, принятых для оценки кожно-раздражающего действия при тестировании на лабораторных животных [5], ГЭ-АЛК не способен к индукции выраженных местно-раздражающих свойств.

После введения ГЭ-АЛК в нижний конъюнктивальный свод правого глаза в течение 1 часа у кроликов наблюдали обильное слезотечение, умеренное покраснение сосудов конъюнктивы и отек век, в результате чего глаз закрыт полностью (блефароспазм).

Симптомы повреждения слизистых оболочек глаза сохраняются в течение 9 дней наблюдения, после чего животные полностью восстанавливаются. Оценка раздражающего действия на слизистые оболочки глаз кроликов и классификацию выраженности раздражающего действия ГЭ-АЛК проводили по [5]. Результаты изучения представлены в таблице 5.

Таким образом, итоговая степень повреждающего действия ГЭ-АЛК по суммации баллов интенсивности каждого из симптомов раздражающего действия на слизистые оболочки глаз (в сумме 8 баллов) позволяет отнести, согласно классификации [5], данное соединение к 3 классу – химическим соединениям, обладающим выраженным раздражающим действием.

Вызываемый однократной инстилляцией ГЭ-АЛК местный воспалительный процесс патологически характеризуется как серозный блефароконъюнктивит.

Выявление сенсibilизирующего действия ГЭ-АЛК проводили на седьмые сутки опыта в тесте опухания лапы на белых мышах (ТОЛМ). Результатами исследований установлено, что исследуемое вещество не вызывает развитие у белых мышей гиперчувствительность замедленного типа (таблице 6).

Таблица 5 – Количественная оценка ирритативного действия ГЭ-АЛК на слизистые оболочки глаз кроликов

Симптомы повреждения	Характеристика выраженности симптомов	Оценка, баллы
Гиперемия конъюнктивы	Сосуды инъецированы на протяжении 9 суток наблюдения	1
Отек век	Блефароспазм в течение 24 часов после воздействия, проявления отека век исчезают на 5-е сутки наблюдения	4
Выделения из глаза	Количество выделений увлажняет веки и окружающие ткани в 1-е сутки после воздействия, выделения из глаза регистрируются на протяжении 5 суток наблюдения	3

Таблица 6 – Величина отека лапы при исследовании сенсibilизирующего действия ГЭ-АЛК в тесте опухания лапы у мышей, М(±95%ДИ)

Показатели индукция гиперчувствительности замедленного типа	Группы сравнения	
	контроль	опыт
Величина толщины лапы мыши до введения разрешающей дозы, мм	1,31 (1,26–1,36)	1,36 (1,32–1,39)
Величина толщины лапы мыши через 24 часа после введения разрешающей дозы, мм	1,33 (1,27–1,38)	1,39 (1,35–1,42)
Среднегрупповой показатель ТОЛМ в абсолютных единицах, 10^{-2} мм	1,6 (0,7–2,5)	2,8 (1,7–3,9)

Так, абсолютная величина отека лапы у опытных животных статистически значимо не отличалась от контрольных значений. В связи с тем, что среднегрупповой показатель отека у опытных и контрольных животных в абсолютных единицах не превышал 0,1 мм, количественную оценку теста опухания лапы мышей в относительных единицах (ТОЛМ в баллах) не проводили (0 баллов в опыте и контроле).

Следовательно, ГЭ-АЛК не обладает сенсibilизирующей способностью при однократном внутрикожном введении, то есть не индуцирует аллергологически значимых проявлений при моделировании гиперчувствительности замедленного типа у белых мышей.

Выводы

Экспериментально установленные закономерности проявления токсических свойств ГЭ-АЛК свидетельствуют, что при использовании принятых методических схем проведения опытов препарат не способен к индукции признаков раздражения кожных покровов и не обладает трансдермальной и ингаляционной токсичностью. ГЭ-АЛК относится к химическим соединениям, обладающим выраженным ирритативным действием (3 класс), вызывая при однократной инстилляции серозный блефароконъюнктивит. ГЭ-АЛК не индуцирует аллергологически значимых проявлений при моделировании гиперчувствительности замедленного типа у белых мышей.

Список литературы

1. Стимуляция роста и развития растений ячменя липофильными эфирами 5-аминолевулиновой кислоты / С. Г. Спивак [и др.] // Доклады Нац. акад. наук Беларуси. – 2007. – Т. 51, № 5. – С. 95–99.

2. Маркова, А. С. «Зеленая химия» – эффективный инструмент снижения риска воздействия химических веществ на здоровье человека и окружающую среду / А. С. Маркова // Токсиколог. вестн. – 2012. – № 5, 116. – С. 53–55.

3. Единые санитарно-эпидемиологические и гигиенические требования к товарам, подлежащим санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю) : утв. Решением Комиссии таможенного союза от 28 мая 2010 года № 299. – Гл. II, раздел 15 : Требования к пестицидам и агрохимикатам.

4. Надлежащая лабораторная практика : ТКП 125-2008 : утв. Постановлением М-ва здравоохранения Респ. Беларусь 28.03.2008, № 56. – Введ. 01.05.2008. – Минск, 2008. – 35 с.

5. Требования к постановке экспериментальных исследований для первичной токсикологической оценки и гигиенической регламентации веществ : инструкция : утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 14.12.04. – Минск, 2004. – 43 с.

6. Беленький, М.Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта / М.Л. Беленький. – Рига : Изд-во Акад.наук Латв.ССР, 1959. – 115 с.

7. Гигиенические нормативы 1.1.9-23-2002. Гигиенические критерии для обоснования необходимости разработки ПДК и ОБУВ (ОДУ) вредных веществ в воздухе рабочей зоны, атмосферном воздухе населенных мест, воде водных объектов : утв. постановлением Гл. гос. сан. врача Респ. Беларусь 31.12.2002 г, № 149.

TOXICOLOGICAL EVALUATION HEXYL ETHER OF 5-AMINOLEVULINIC ACID AT DIFFERENT WAYS AND MODES SINGLE EXPOSURE

E.K. Vlasenko, S.I. Sychik, V.A. Stel'makh, V.A. Grynchak

Republican unitary enterprise «Scientifically Practical Center of Hygiene», Minsk, Belarus

Hexyl ester of 5-aminolevulinic acid (ALA ET-) recognized as promising for the ecological crop growth regulator crops [1]. In order to study and conduct activities aimed at the protection of human health and its habitat at the stage of design / development of chemical products and / or processes of production [2], and in accordance with the requirements of international law [3] in the first stage of deployed toxicological-gigienicheskikh studies are needed to identify patterns of symptoms of toxic properties of the ET-ALA in acute experiments in conditions of his inhalation and epikutannogo exposure, assess the impact of the mucous membranes and body of laboratory animals, perform tests allergobezопасnost.