

# ОСНОВНЫЕ ПАРАМЕТРЫ ТОКСИКОМЕТРИИ ГЕКСИЛОВОГО ЭФИРА 5-АМИНОЛЕВУЛИНОВОЙ КИСЛОТЫ В УСЛОВИЯХ ОДНОКРАТНОГО И ПОВТОРНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ

Власенко Е.К., Стельмах В.А., Грынчак В.А.

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

**Резюме.** В эксперименте на белых мышах исследовали особенности токсического действия гексилового эфира 5-аминолевулиновой кислоты в условиях однократного и повторного внутрижелудочного введения. Установлены величины токсических и среднесмертельных доз, порог острого действия, изучены проявления интоксикации. На основании полученных данных определен показатель зоны острого действия и класс опасности соединения по ГОСТ 12.1.007-76. Величина коэффициента кумуляции, полученная по методу Lim et al. в опытах на мышах составляет 6,1, что свидетельствует о наличии адаптации животных к данному соединению.

**Ключевые слова:** токсичность, гексиловый эфир 5-аминолевулиновой кислоты, кумулятивные свойства

**Summary:** In the experiment on white mice to investigate the features of toxic action hexyl ester of 5-aminolevulinic acid in the conditions of single and repeated intragastric administration. Set the value of the mean and the toxic dose threshold of acute effect, studied manifestations of intoxication. Based on these data the index zone acute hazard class actions and connections in accordance with GOST 12.1.007-76. The coefficient of cumulation obtained by the method of Lim et al. in mice was 6.1, indicating the presence of adaptation of animals to the compound.

**Key words:** toxicity, hexyl ester of 5-aminolevulinic acid, the cumulative properties

**Введение.** Для обеспечения безопасного обращения и минимизации рисков здоровью работающих на производстве и при применении необходимо дать перспективному отечественному регулятору роста растений на основе гексилового эфира 5-аминолевулиновой кислоты (ГЭ-АЛК) [1, 2] полную токсиколого-гигиеническую оценку. Особая роль в данных исследованиях принадлежит токсикологическому эксперименту на

теплокровных животных, который позволяет определить порог вредного действия химического фактора.

Целью нашего исследования является установление параметров острой токсичности и количественная оценка кумулятивных свойств ГЭ-АЛК в условиях внутрижелудочного введения белым мышам. Задачи исследования заключаются в определении среднесмертельных и токсических доз, порога острого действия, половой чувствительности, установление коэффициента кумуляции и возможности адаптации организма к воздействию данного соединения.

**Материалы и методы.** Изучение токсических свойств при однократном внутрижелудочном введении ГЭ-АЛК проведено в эксперименте на 128 белых нелинейных мышах (17-23г) обоего пола. Острое отравление моделировали однократным введением ГЭ-АЛК в желудок подопытных животных с помощью иглы-зонда. В качестве растворителя использовали дистиллированную воду. Каждую дозу испытывали на 5-6 животных с последующим наблюдением в течении 14 суток с регистрацией клинической картины отравления и симптомов интоксикации. Объем вводимых доз не превышал 0,2 мл/10 г массы тела. Количественные параметры острой токсичности определяли пробит-анализом по методу Литчфилда и Уилкоксона в изложении М.Л. Беленького с уточнением характеристик потенциальной опасности смертельного отравления [3].

Определение порога вредного действия ГЭ-АЛК ( $Lim_{ac}$ ) в условиях однократного внутрижелудочного поступления произведено на самцах нелинейных белых мышей. Величину  $Lim_{ac}$  устанавливали с учетом изменения показателей ориентировочно-исследовательской активности, массы тела и морфологического состава периферической крови. Опыт предусматривал затравку трех групп животных (по 7 особей в каждой группе) в сублетальных дозах. Контрольным животным вводили растворитель – дистиллированную воду. Ориентировочно-исследовательскую активность мышей исследовали в тесте «открытое поле».

Количественную оценку кумуляции функционального типа проводили с использованием метода «субхронической токсичности» Lim et al. [4] на самцах белых мышей (20 особей в опытной группе и 20 – в контрольной, которым вводили дистиллированную воду). В ходе эксперимента регистрировали сроки гибели животных, затем рассчитывали среднесмертельную дозу  $DL_{50\ subchr}$  и коэффициент кумуляции  $K_{cum}$ .

Результаты исследований обрабатывали общепринятыми методами вариационной статистики. Обращение с животными при подготовке и проведении экспериментов осуществляли в соответствии с основными этическими принципами надлежащей лабораторной практики [5].

**Результаты и обсуждение.** При однократном внутрижелудочном введении ГЭ-АЛК самцам и самкам белых мышей в диапазоне испытанных доз от 2000 до 5000 мг/кг наблюдали признаки интоксикации в виде сгорбленного положения тела, тремора передних и задних конечностей, нарушения координации движения, учащенного дыхания, судороги, у отдельных животных – паралич задних конечностей. Гибель наступала через 5-15 мин после введения исследуемого соединения.

Основные количественные параметры и характеристики опасности потенциального внутрижелудочного отравления при однократном воздействии ГЭ-АЛК представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Параметры токсичности и потенциальной опасности острого отравления гексилового эфира 5-аминолевулиновой кислоты при однократном внутрижелудочном введении

Вид, пол животны х	Величины летальных доз, мг/кг			Показатели потенциальной опасности острого отравления	
	DL <sub>16</sub>	DL <sub>50</sub>	DL <sub>84</sub>	S - функция угла наклона прямой "доза-эффект"	R - размах летальных доз
Мыши самцы	2540	3000 (2630÷3420)	3540	1,18 (0,99÷1,4)	1,39
Мыши самки	2470	3170 (2710÷3710)	3900	1,26 (1,13÷1,41)	1,58

Величина среднесмертельной дозы при однократном внутрижелудочном воздействии на самцах мышей составляет 3000 мг/кг, что позволяет отнести ГЭ-АЛК к III классу опасности согласно ГОСТ 12.1.007-76 [6].

Порог острого действия установлен на самцах белых мышей, которым однократно внутрижелудочно вводили водный раствор ГЭ-АЛК. Сравнение проводили между группами: I-контрольной и II, III, IV-опытными, которые подвергались экспозиции ГЭ-АЛК в сублетальных дозах 30, 300 и 1500 мг/кг (кратных 1/100, 1/10 и 1/2 от DL<sub>50</sub>, соответственно). После введения исследуемого соединения каждое животное выдерживали в индивидуальной клетке 5 минут, затем помещали в установку «открытое поле», где устанавливали наблюдение за поведением в течение 5 минут. Результаты наблюдений свидетельствуют об угнетении вертикальной и исследовательской активности, а также об изменении эмоциональности мышей, получавших ГЭ-АЛК в дозе 1500 мг/кг (табл. 2).

Таблица 2 – Показатели поведения самцов белых мышей при однократном внутрижелудочном введении сублетальных доз ГЭ-АЛК, Me[25%;75%]

Группы сравнения	Показатели			
	Количество пересеченных секторов	«Норковый рефлекс»	Количество вертикальных стоек	Количество эпизодов груминга
I контрольная	28,0 [12,0;61,0]	7,0 [3,0;10,0]	1,0 [0,0-6,0]	2,0 [1,0-2,0]
II 30 мг/кг	64,0 [27,0;81,0]	8,0 [5,0;13,0]	6,0 [0,0-10,0]	2,0 [0,0-2,0]
III 300 мг/кг	44,0 [29,0;70,0]	1,0 [0,0;2,0]	5,0 [0,0-6,0]	0,0 [0,0-1,0]
IV 1500 мг/кг	22,0 [4,0;35,0]	1,0 [0,0;2,0]*	0,0 [0,0-0,0]*	0,0 [0,0-0,0]*

Примечание: \* - различия достоверны при  $p \leq 0,05$ .

Введение ГЭ-АЛК в дозе 1500 мг/кг вызывает достоверное снижение ряда показателей: «норкового рефлекса» - в 7 раз, количества вертикальных стоек и эпизодов груминга - до нулевых значений. При этом, показатель горизонтальной активности данной подопытной группы (количество пересеченных секторов) не отличался от такового в контроле. В группах животных, получавших ГЭ-АЛК в дозах 30 и 300 мг/кг не отмечено статистически значимых отклонений показателей от контроля.

Величина среднеэффективной дозы ( $ED_{50}$ ) рассчитана пробит-анализом по методу Литчфилда и Уилкоксона в изложении М.Л. Беленького [3] по наиболее чувствительному поведенческому показателю, выходящему за пределы границ доверительного интервала среднегруппового значения контрольной группы. Результаты вычислений представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Расчеты эффективных доз по показателям поведенческой активности белых мышей при однократном внутрижелудочном введении сублетальных доз ГЭ-АЛК

Показатель поведенческой активности	Величины эффективных доз, мг/кг		
	$ED_{16}$	$ED_{50}$	$ED_{84}$
Количество вертикальных стоек, штук	30	160 (46÷560)	860
Количество эпизодов груминга, штук	16	73 (23÷234)	340

Как видно из таблицы 3, при переходе к альтернативной форме учета токсического эффекта наиболее чувствительным является показатель «количество эпизодов груминга». Таким образом, среднеэффективная доза ( $ED_{50}$ ) ГЭ-АЛК, полученная в результате изучения поведенческой активности мышей составляет 73 мг/кг, что соответствует  $1/40 DL_{50}$ .

По окончании учета показателей поведенческой активности за состоянием подопытных животных наблюдали в течение одних суток. За период наблюдения летальных исходов не зарегистрировано, состояние мышей во всех подопытных группах удовлетворительное. Заметных изменений веса и гематологических показателей мышей, которым вводили ГЭ-АЛК по сравнению с контролем не зафиксировано.

Традиционно в качестве пороговой предполагается наименьшая действующая доза химического соединения, вычисленная по результатам статистической обработки в сравнении с контролем. Учитывая, что только при оценке поведения нами получены достоверные изменения физиологического статуса подопытных животных, считаем возможным установление порога острого действия  $Lim_{ac}$  ГЭ-АЛК на уровне среднеэффективной дозы  $ED_{50}$  - 73 мг/кг.

При изучении кумулятивных свойств ГЭ-АЛК методом  $Lim\ et\ al.$  за время опыта отмечена гибель 17 из 20 мышей. Суммарная доза на 28 сутки опыта составила 38604 мг/кг. Подавляющую часть летальных исходов регистрировали начиная с 17-х суток эксперимента. Гибель животных в контрольной группе отсутствовала. Величина среднесмертельной дозы  $DL_{50\ subchr}$ , вычисленная с применением пробит-анализа, составляет 18250 мг/кг. Ранее нами установленная величина  $DL_{50\ ac}$  равна 3000 мг/кг (мышь самец), следовательно, величина коэффициента кумуляции  $K_{cum}$  равна 6,1.

Метод «субхронической токсичности»  $Lim\ et\ al.$  обычно применяют для оценки адаптации организма к изучаемому соединению: если  $K_{cum}$  меньше 1 - наличие кумуляции, если больше 1 - развитие привыкания [4]. Установленная величина коэффициента кумуляции 6,1 свидетельствует о способности мышей адаптироваться к введению массивных доз ГЭ-АЛК: величина суммарной дозы к окончанию эксперимента была кратная  $13 DL_{50\ ac}$ , а подавляющая часть летальных исходов зарегистрирована в диапазоне суммарных доз кратных 4-13  $DL_{50\ ac}$ .

**Выводы.** Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что при однократном внутрижелудочном введении среднесмертельная доза  $DL_{50}$  ГЭ-АЛК для самцов мышей составляет 3000 мг/кг, для самок мышей – 3170 мг/кг. Порог острого действия  $Lim_{ac}$  установлен на уровне среднеэффективной дозы  $ED_{50}$  - 73 мг/кг. Величина показателя зоны острого действия рассчитанная по соотношению  $DL_{50}/Lim_{ac}$

составляет 41. В картине острого отравления преобладают тремор, судороги, сгорбленное положение тела, нарушение координации движения. Полученные экспериментальные данные позволяют отнести гексилый эфир 5-аминолевулиновой кислоты к III классу опасности при однократном внутрижелудочном введении согласно ГОСТ 12.1.007-76. В тесте «субхронической токсичности» по схеме Lim et al. показана способность животных к адаптации к введению нарастающих количеств изучаемого соединения ( $K_{cum}=6,1$ ).

### Литература

1. Кабашникова, Л.Ф. Способ ранней диагностики эффективности многокомпонентных капсулирующих составов для обработки семян. Методические указания / Л.Ф. Кабашникова. – Мн.: ИООО «Право и экономика», 2003. – 31 с.
2. Стимуляция роста и развития растений ячменя липофильными эфирами 5-аминолевулиновой кислоты / С.Г. Спивак, Е.Б. Яронская, И.В. Вершиловская, В.Ю. Давыдов, И.В. Тростянка, В.И. Долгопалец, Н.Г. Аверина, М.А. Кисель // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2007. – Т. 51, № 5. – С. 95-99.
3. Беленький, М.Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта / М.Л. Беленький. – Рига: Изд-во Акад. наук Латв. ССР, 1959. – 115 с.
4. Lim R. K., Rink K. G., Glass H. G., Soaje-Echague E. A method for the evaluation of cumulation and tolerance by the determination of acute and subchronic median effective doses // Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. – 1961. – 130, Mar 1. – С. 336-353.
5. 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.
6. ГОСТ 12.1.007-76. ССБТ. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности. – 6 с.