

УДК 615.9: 616.152.21: 591.481

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ КАК ИНСТРУМЕНТ ОЦЕНКИ ВОЗДЕЙСТВИЯ ХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА ОРГАНИЗМ ЧЕЛОВЕКА

Соседова Л.М.

*ФГБУН Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований,
Ангарск, Россия; sosedlar@mail.ru*

В материалах представлены особенности методических подходов при выполнении экспериментальных исследований по изучению воздействия факторов окружающей среды на организм человека. Показаны результаты собственных экспериментов, проведенных в Институте, при моделировании биологических эффектов антимикробных нанобиокомпозигов с частицами наносеребра, химических производственных факторов на фоне отягощающего воздействия. Доказана значимость внутриклеточной протеомики при оценке эффектов действия наночастиц и наноматериалов на организм. Выявлены ключевые звенья прогрессивного течения ртутной интоксикации в отдаленном периоде. Доказана отягощающая роль пренатальной гипоксии в развитии интоксикации у крыс в половозрелом возрасте.

Ключевые слова: моделирование, лабораторные животные, токсическая энцефалопатия, потомство белых крыс, пренатальная гипоксия белых крыс, нанобиокомпозигов, химический фактор.

Введение

В методологии изучения влияния химического загрязнения объектов окружающей среды на состояние здоровье населения одна из основных ролей принадлежит экспериментальным исследованиям на лабораторных животных. Именно, так называемая, трансляционная медицина дает возможность моделировать на лабораторных животных патологические состояния и различные характерные для человека заболевания, возникающие при воздействии неблагоприятных экологических и производственных факторов. Моделирование на экспериментальных животных является основным звеном доказательной медицины, позволяющим изучить патогенетическую структуру и механизмы формирования исследуемых процессов. При этом результаты биомоделирования должны соответствовать основным принципам и постулатам доказательной медицины, одними из которых являются адекватность создаваемой модели патологии

человека задачам исследований, допустимость переноса экспериментальных данных с модели на человека, корректный выбор информативных и доступных критериев и методов оценки патологического процесса в организме лабораторных животных [1].

Конечным итогом биомоделирования должны являться лечебно-профилактические рекомендации, направленные на выявленные при экспериментальных исследованиях точки приложения патологического процесса. Целью настоящих исследований явилось выяснение роли биомоделирования и разработка методологических подходов в решении вопросов, связанных с воздействием неблагоприятных химических факторов на организм человека.

Материалы и методы

Модельные эксперименты проведены на 360 беспородных белых крысах. Экспериментальных животных содержали в специальном помещении с 12 часовым светлым/тёмным циклом, регулиру-

емой температурой и влажностью, со свободным доступом к чистой водопроводной воде и пище, включающей в себя все необходимые витамины и микроэлементы в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных целей (Страсбург, 1986) а также «Правил лабораторной практики» (приказ Минздрава от 23 августа 2010 г. № 708н). Во всех сериях моделирования использовали половозрелых лабораторных животных, кроме отдельных экспериментов, в которых обследовали новорожденных крыс, при этом в каждой экспериментальной группе было по 8-10 животных. Умерщвление животных проводилось методом декапитации в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденными приказом МЗ СССР от 12.08.1977 г.

Экспериментальное моделирование биологических эффектов действия нового перспективного антимикробного нанобиокомпозита на основе трансмембранного биополимера арабиногалактана и инкапсулированных в него наночастиц серебра, разработанного в Институте химии им. А.Н.Фаворского [2], выполняли на беспородных белых крысах в подострых опытах путем внутрижелудочного введения нанобиокомпозита наносеребра — НАГ (размер наночастиц 10-12 нм, содержание серебра — 16,73 %) в дозе 100 мкг/кг массы. Наночастицы серебра в биокомпозите инкапсулированы в полимерную матрицу — арабиногалактан, выделенную из лиственницы сибирской. Оценку воздействия нанобиокомпозита проводили интегрально, изучая состояние системы перекисного окисления липидов (ПОЛ) и антиоксидантной системы (АОС) и на субклеточном уровне при помощи иммуногистохимического метода определения экспрессии белка bcl-2 и caspase 3 в нервных клетках в соответствии с протоколом, предложенным производителем (Menzel,

Германия).

Экспериментальное моделирование нейроинтоксикаций включало воздействие на лабораторных животных винилхлоридом, дихлорэтаном, парами металлической ртути, сулемой, толуолом при различных путях (ингаляционный, внутрижелудочный) и сроках (от двух до восьми недель) введения их в организм белых крыс. Наряду с этим, для решения поставленных задач в динамике обследовали морфофункциональное состояние ЦНС у новорожденного и половозрелого потомства, полученного от животных с нейроинтоксикацией сулемой (6 недель самцам белых крыс подкожно вводили раствор сулемы: 0,05 мг ртути на 100 г массы тела животного) и винилхлоридом (8 недель самцы опытной группы ингаляционно получали винилхлорид в концентрации 1200 мг/м³). Отдельно моделировалось воздействие толуолом на животных с грузом внутриутробной гипоксии. Моделирование острой (на 13-14 день внутриутробного развития) и хронической (с 10 по 19 день внутриутробного развития) пренатальной гипоксии проводили нитритом натрия по собственной методике [3]. Последующую ингаляцию толуолом трехмесячных белых крыс с пренатальной гипоксией осуществляли в газовых камерах на протяжении 1 месяца по 4 часа 5 дней в неделю в концентрации 150 ppm.

Обследование животных осуществляли классическими методами, принятыми в токсико-гигиенических исследованиях, включающими биохимический, алергологический, поведенческий, электронейрографический, гистологический, морфометрический анализ [4], а также, в соответствии с разработанными нами методическими рекомендациями «Методы комплексной оценки поведения лабораторных крыс, используемых для экспериментально-гигиенических исследований», утвержденными на Заседании Научного Совета по медико-экологическим проблемам здоровья работающих РАМН 24 июня 2011 г. Статистическую обработ-

ку результатов проводили с помощью пакета прикладных программ «Statistica 6.0» (Statsoft, США). Статистическую значимость различий в независимых выборках определяли по методу Манна — Уитни. Достигнутый уровень значимости признаков — при $p < 0,05$.

Результаты

В последние годы появился новый класс соединений, требующий пристального исследования специфических биологических эффектов на организм человека и лабораторных животных — это наночастицы, наноматериалы и нанокompозиты. Существующий подход к проведению исследований и оценке безопасности наноматериалов основан на принципах и критериях классической токсикологии. Создание в стране опытно-промышленных производств нанопрепаратов и предприятий с использованием нанотехнологий опережает разработку методических подходов к гигиеническому нормированию наночастиц в окружающей среде. Перспективность широкого внедрения нанокompозитных материалов требует своевременного углубленного изучения ответной реакции организма, в связи с возможным риском здоровью людей, имеющих с ними непосредственный контакт. Как показали полученные нами результаты биомоделирования воздействия нанобиокompозита на основе трансмембранного биополимера арабиногалактана и инкапсулированных в него наночастиц серебра, ответная реакция организма экспериментальных животных заключалась в повышении активности процессов АОС (увеличение содержания SH-глутатиона и повышение активности каталазы), отсутствие достоверных изменений в системе ПОЛ. Несмотря на кажущееся благополучие со стороны интегральных показателей организма, одновременно были выявлены морфофункциональные нарушения в структуре нервной ткани: периваскулярный отёк сосудов головного мозга, набухание проводящих волокон в подкорковых структурах, расширение сосудов и

разрыхление нейропиля. Ультраструктурный анализ нейронов коры головного мозга выявил в гистологических препаратах животных деформацию ядер. В целом морфологическое исследование головного мозга лабораторных животных, подвергавшихся воздействию НАГ, выявило изменения, обычно сопровождающие метаболические сдвиги в структуре клеток и тканей. Вероятно, это связано с развитием компенсаторно-приспособительных реакций, возникающих в ответ на проникновение чужеродного агента через гемато-энцефалический барьер и характерно для перестройки функционального состояния организма на новый устойчивый уровень. Однако анализ ядер нейронов, с выявленной неправильной деформированной формой, свидетельствует о неблагоприятном воздействии наночастиц серебра на внутриклеточные структуры и является косвенным подтверждением способности наносеребра проникать из полимерной матрицы в головной мозг.

Анализ активности регуляторных белков в нейронах при воздействии изучаемого нанобиокompозита свидетельствовал об увеличении экспрессии в нейронах анти/проапоптотических белков bcl-2 и caspase3. Иммуногистохимическое исследование экспрессии белкового фактора bcl-2, одной из функций которого, как известно, является предотвращение запуска процесса апоптоза, показало, что при введении эквивалентной дозы «чистого» арабиногалактана достоверных по сравнению с контролем изменений процентного содержания клеток, экспрессирующих bcl-2, по отношению к их общему количеству практически не происходило. Вместе с тем при введении НАГ выявлялось статистически значимое возрастание количества нормальных нейронов, экспрессирующих bcl-2 — 2, однако протективное действие данного белка не реализуется в полной мере, что приводит к достоверному повышению содержания поврежденных гиперхромных клеток. При обследовании

через 6 месяцев выявленная направленность изменений сохранялась.

При исследовании экспрессии эффекторного белка caspase-3, который активирует процесс апоптоза, при воздействии НАГ выявлено достоверное изменение содержания всех типов исследуемых клеток. Наблюдалось сокращение на единицу площади количества нормальных клеток без экспрессии проапоптотического белка caspase-3. В то время как количество клеток, экспрессирующих caspase-3 значительно повысились. Выявленные результаты свидетельствуют об активации апоптотических процессов уже на 10-й день после окончания воздействия нанобиокомпозита. Это сочетается с данными экспрессии ингибитора апоптоза bcl-2, который в ответ на активацию апоптотического процесса при воздействии НАГ начинает в эти же сроки оказывать протективное действие [5, 6]. В отдаленном периоде обследования количество клеток, экспрессирующих белок caspase-3, становится еще выше, что свидетельствует о нарастании с течением времени процесса апоптоза при воздействии нанобиокомпозита на природной матрице-арабиногалактан, на фоне функционального старения и истощения клеток головного мозга. Появление отдаленных эффектов действия при введении крысам нанобиокомпозита серебра и отсутствие подобных при воздействии «чистым» АГ может быть обусловлено физико-химическими свойствами наночастиц серебра: такими, как длительное персистирование в организме, способность к материальной кумуляции и к образованию конгломератов в структурах клетки и межклеточном пространстве. При этом длительное нахождение и незначительная элиминация наночастиц серебра из организма вполне вероятно способствует формированию накопленных неблагоприятных эффектов.

Таким образом, по нашему мнению, оценка эффекта действия наночастиц и нанокompозитов на организм должна

проводиться не только методами классической токсикологии, но и на основании результатов ультрамикроскопических исследований клеток-мишеней (электронно-микроскопическая, конфокальная микроскопия, внутриклеточная протеомика, метаболомика с использованием различных меток) и в течение длительного периода наблюдений. Возникающие при этом морфофункциональные клеточные и внутриклеточные изменения, следует рассматривать как этиопатогенетический фактор, играющий определенную роль в формировании соматической патологии, в том числе и в отдаленные сроки.

В последнее десятилетие в Институте активно разрабатываются методологические подходы к моделированию на лабораторных животных (белых крысах) токсической энцефалопатии при воздействии различных химических токсикантов. Экспериментальное моделирование позволило выявить основные точки реализации патологического процесса и факторы, обуславливающие формирование и прогрессирование токсической энцефалопатии в отдаленном периоде. На примере ртутной токсической энцефалопатии предложена методология биомоделирования токсической энцефалопатии и обоснованы критерии достоверности формирования энцефалопатии у лабораторных животных [7]. Нейровизуализация патологического процесса при ртутной энцефалопатии с позиций доказательной медицины позволила выявить ключевые звенья ее прогрессивного течения в отдаленном периоде интоксикации: сохранение дистрофии нейронов; прогрессирующее снижение плотности расположения нормальных нейронов на единицу площади; нарастающая демиелинизация нейронов; наличие периваскулярного и перицеллюлярного отека и стаза сосудов; изменение экспрессии нейроспецифических белков.

Актуальность исследований отдаленных последствий воздействия хими-

ческих токсикантов в последующих поколениях определяется не только недостаточным количеством в современной отечественной и зарубежной литературе сведений о влиянии интоксикаций родителей на становление основных физиологических функций организма потомства, но и необходимостью изучения вклада предшествующих неблагоприятных факторов в течение патологических процессов, обусловленных воздействием факторов окружающей среды. На примере интоксикаций белых крыс сулемой и винилхлоридом нами совершенствуются методические подходы к изучению влияния химического груза родителей на последующие поколения [8]. Показано, что у потомства первых дней жизни, полученного от белых крыс-самцов с винилхлоридной и сулемовой интоксикацией, выявлено отставание развития сенсорно-двигательных реакций. У половозрелого потомства первого и второго поколений установлено нарушение целостной структуры поведения, характеризующееся снижением двигательной активности, ориентировочно-исследовательских реакций и повышением тревожности. При электронейромиографическом исследовании нервно-мышечной проводимости задних конечностей у половозрелого потомства белых крыс первого поколения, полученных от животных как с интоксикацией винилхлоридом, так и сулемой, выявлены патологические изменения в ответных реакциях нервно-мышечного аппарата, характеризующиеся уменьшением количества функциональных двигательных единиц, участвующих в ответе на стимул, а также снижением амплитуды и длительности М-ответа и возрастанием латентности. Анализ результатов электрофизиологического обследования периферических нервов и мышц задних конечностей белых крыс второго поколения не обнаружил статистически значимых отличий с контролем. Морфологические изменения в нервной ткани потомства белых крыс, подвергавшихся воздействию изучаемых

химических токсикантов, не имели существенных качественных различий и характеризовалась дистрофическими изменениями нейронов коры головного мозга, повышением проницаемости сосудов, вакуолизацией клеток глии с уменьшением количества глиальных элементов, выраженным отеком лимбической коры, спонгиозом подкоркового вещества. Поставленная проблема требует дальнейшего изучения для выявления механизмов данного явления и поднимает вопрос о значимости химического груза родителей для последующих поколений.

Изменение чувствительности к различным химическим веществам является весьма актуальной и малоизученной медико-биологической проблемой в настоящее время. Вместе с тем предрасполагающие факторы риска возникновения патологии ЦНС, без знания которых невозможна разработка профилактики и коррекции нарушений, пока еще недостаточно изучены и могут иметь важное прикладное значение для диагностики предпатологических состояний, а также процессов, связанных с нейродегенеративными процессами и гибелью нервных клеток. Сведений о влиянии груза внутриутробной гипоксии на формирование нарушений ЦНС при воздействии в процессе онтогенеза нейротоксикантов в доступной литературе мы не встретили. В результате экспериментальных исследований подтверждена выдвинутая нами гипотеза об отягощающем влиянии пренатальной гипоксии на проявления нейротоксического эффекта толуола, тем самым выявлен один из возможных системных механизмов формирования высокой чувствительности к действию нейротропных химических факторов. Экспериментальными исследованиями на белых крысах показано, что интоксикация толуолом половозрелых животных с пренатальной гипоксией вызывает развитие выраженных нарушений двигательного поведения, снижение кратковременной и долговременной памяти, способности к

обучению и пространственной ориентации, повышение внутривидовой агрессивности, а также морфофункциональные изменения ЦНС. Показано, что нейробиологическими признаками интоксикации толуолом белых крыс с пренатальной гипоксией являются повышение латентности и изменения амплитуды основных пиков N1, P2, N2, P3 слуховых и зрительных вызванных потенциалов, свидетельствующих о нарушении корково-подкоркового взаимодействия [9].

Таким образом, экспериментальные исследования в токсикологии дают возможность объективно оценивать воздействие различных факторов окружающей среды на организм, выявлять точки приложения и механизмы их неблагоприятного действия. Визуализация патологического процесса при экспериментальном моделировании, с позиций доказательной медицины направлена на прицельные, патогенетически обоснованные лечебно-профилактические мероприятия: первоначально, в экспериментальных условиях, а в дальнейшем и при реабилитации больных или пострадавших.

В целом биомоделирование дает в руки инструмент управления рисками и механизмами формирования патологических процессов при воздействии химических факторов на организм человека. Разработка методических подходов к персонализированной медицине начинается с трансляции результатов эксперимента на организм человека. В то же время обоснование персонализированных критериев риска, основанное на экспериментальном моделировании, требует осторожного подхода к интерпретации полученных на лабораторных животных результатов, вместе с тем они способствуют развитию новых направлений научных исследований, как в клинической практике, так и в эксперименте.

Литература

1. Каркищенко Н.Н. Основы биомоделирования [Текст] / Н.Н.Каркищенко.-М.: Изд-во ВПК, 2004. -342с.

2. Shurygina I. A, et. al. Bactericidal action of Ag (0) -antithrombotic sulfated arabinogalactan nanocomposite: coevolution of initial nanocomposite and living microbial cell to a novel nonliving nanocomposite / I. A.Shurygina // Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine. -2011.-P. 7.-S. 827-833.
3. Соседова Л.М. и др. Способ моделирования гипоксической энцефалопатии в пренатальный период у мелких лабораторных животных. Патент RU 2497202, 2013.
4. Общая токсикология [Текст] / Под ред. Б. А. Курляндского, В. А. Филова. М.: Медицина, 2002.-579с.
5. Титов Е.А., Новиков М.А. Экспрессия bcl-2 как критериальный показатель воздействия нанобиокомпозигов [Текст] / Е.А.Титов, М.А.Новиков //Токсикологический вестник.- 2014. — № 4. С. 34-38.
6. Новиков М.А. и др. Реакция белых крыс при внутрижелудочном введении вновь синтезированного нанобиокомпозигов на основе частиц Ag (0) и арабиногалактана [Текст]/М.А.Новиков и др. // Химико-фармацевтический журнал.-2014.-6.-С.34-39.
7. Соседова Л.М. Научно-методические основы моделирования ртутной токсической энцефалопатии [Текст] / Л.М.Соседова Токсикологический вестник.-2010.-№1.-С. 21-25.
8. Капустина Е.А. Развитие потомства самцов и самок аутбредных крыс, подвергавшихся воздействию сулемы [Текст] / Е.А.Капустина // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН.-2013.-№1 (89) .-С. 102-105.
9. Вокина В.А. и др. Нейротоксический эффект толуола на фоне пренатального гипоксического повреждения головного мозга белых крыс [Текст] / В.А.Вокина и др. // Медицина труда и промышленная экология. — 2014. — №4. — С. 30 — 34.

References

1. Karkischenko NN Basics biomodeling [Text] / N.N.Karkischenko. M .: Publishing House of the MIC, 2004. -342s.
2. Shurygina I. A, et. al. Bactericidal action of Ag (0) -antithrombotic sulfated arabinogalactan nanocomposite: coevolution of initial nanocomposite and living microbial cell to a novel nonliving nanocomposite / IAShurygina // Nanomedicine: Nanotechnology, Biology,

- and Medicine. -2011.-R. 7.-S. 827-833.
3. LM Sosedova et al. A method of modeling of hypoxic encephalopathy prenatal in small laboratory animals. Patent RU 2497202, 2013.
 4. General Toxicology [Text] / Ed. BA Kurland, VA Filov. M.: Medicine, 2002.-579s.
 5. Titov EA, Novikov MA Bcl-2 expression as a criteria indicators impact nanobiocomposites [Text] / E.A.Titov, M.A.Novikov // Poison vestnik.- 2014. - № 4. С. 34-38.
 6. Novikov MA and others. The response of white rats at intragastric introduction of newly synthesized nanobiokpozita based particle Ag (0) and arabinogalactan [Text] / M.A.Novikov et al. // Chemical-Pharmaceutical zhurnal.-2014-6.-P.34 -39.
 7. LM Sosedova Scientifically-methodical bases of modeling of mercury toxic encephalopathy [Text] / L.M.Sosedova Poison vestnik.-2010.-№1.-С. 21-25.
 8. EA Kapustin Development of the offspring of male and female outbred rats exposed to mercuric chloride [Text] / E.A.Kapustina // Bulletin ESSC SB RAMN.-2013.-№1 (89). С. 102-105.
 9. Vokina VA and others. Neurotoxic effect of toluene on a background of prenatal hypoxic brain injury of white rats [Text] / V.A.Vokina et al. // Medicine of work and industrial ecology. - 2014. - №4. - S. 30 - 34.

Резюме

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ МОДЕЛЮВАННЯ ЯК ІНСТРУМЕНТ ОЦІНКИ ВПЛИВУ ХІМІЧНИХ ФАКТОРІВ НА ОРГАНІЗМ ЛЮДИНИ

Сосєдова Л.М.

В матеріалах представлено особливості методичних підходів при виконанні експериментальних досліджень з вивчення впливу факторів навколишнього середовища на організм людини. Показано результати власних експериментів, проведених в Інституті, при моделюванні біологічних ефектів антимікробних нанобиокомпозитів з частинками наносрібла, хімічних виробничих факторів на фоні обтяжливого впливу. Доведена значимість внутрішньоклітинної протеоміки

при оцінці ефектів дії наночастинок та наноматеріалів на організм. Виявлено ключові ланки прогресивного течії ртутної інтоксикації у віддаленому періоді. Доведена обтяжлива роль пренатальної гіпоксії у розвитку інтоксикації у щурів в половозролом віці.

Ключові слова: моделювання, лабораторні тварини, токсична енцефалопатія, нащадків білих щурів, пренатальна гіпоксія білих щурів, нанобиокомпозити, хімічний фактор.

Summary

EXPERIMENTAL MODELING AS A TOOL FOR ASSESSING EXPOSURE TO CHEMICAL FACTORS ON THE HUMAN

Sosedova L.M.

In materials presents particular methodological approaches when performing experimental studies on the impact of environmental factors on the human body. Shows the results of experiments conducted at the Institute, in the simulation of biological effects of antimicrobial nanobiocomposites with nanosilver particles, chemical factors on the background of confounding effects. Proven the significance of intracellular proteomics in the assessment of the effects of nanoparticles and nanomaterials on the body. Identified key drivers to a progressive flow of mercury intoxication in a long-term period. Proven aggravating role of prenatal hypoxia in the development of toxicity in rats in Mature age.

Keywords: modeling, laboratory animals, toxic encephalopathy, offspring of white rats, prenatal hypoxia white rats, nanobiocomposites, chemical factor.

Впервые поступила в редакцию 26.08.2015 г. Рекомендована к печати на заседании редакционной коллегии после рецензирования