

28. МУК 4.1.1483-03. Методы контроля. Химические факторы. Определение содержания химических элементов в диагностируемых биосубстратах, препаратах и биологически активных добавках методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной аргоновой плазмой. – М.: Минздрав России, 2003. – 56 с.

29. Determination of 60 elements in whole blood by sector field inductively coupled plasma mass spectrometry / I. Rodushkin, R. Olofsson, M.D. Axelsson // Journal of Analytical Atomic Spectrometry. – 2000. – Vol. 15, № 8. – P. 937–944.

30. Ribosomal DNA copy number associated with blood metal levels in school-age children: A follow-up study on a municipal waste incinerator in Zhejiang, China / P. Xu, L. Feng, D. Xu, L. Wu [et al.] // Chemosphere. – 2022. – Vol. 307. – P. 135676. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2022.135676

31. High concentration of blood cobalt is associated with the impairment of blood-brain barrier permeability / Z. Li, Z. Wang, K. Xue, Z. Wang [et al.] // Chemosphere. – 2021. – Vol. 273. – 129579. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2021.129579

Оценка токсического действия бисфенолов на экспериментальных моделях *in vitro* и *in vivo*

В.А. Грынчак

Научно-исследовательский институт гигиены, токсикологии, эпидемиологии, вирусологии и микробиологии государственного учреждения «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья», г. Минск, Республика Беларусь

Целью исследования являлась оценка токсического действия бисфенолов А и S на экспериментальных моделях *in vitro* и *in vivo*. Установлено, что бисфенолы А и S относятся к 4-му классу опасности. Однако статистически значимое изменение ряда клинико-лабораторных показателей при однократном воздействии свидетельствует о более выраженном токсическом действии бисфенола А для самцов белых крыс, а также наличии эндокринных нарушений и гипотензивного действия при сравнении с токсическим действием бисфенола S. Воздействие бисфенолов характеризовалось гепато- и нефротоксичностью. Бисфенолы оказывали умеренное раздражающее действие, не вызвали формирование аллергических реакций и признаков раздражения при контакте с неповрежденными кожными покровами. Бисфенол А проявлял эстрогеноподобную активность в МТТ-тесте, в свою очередь бисфенол S оказывал выраженное цитотоксическое действие на фоне отсутствия эстрогеноподобных свойств.

Ключевые слова: бисфенол, токсичность, опасность, эндокринные дизрапторы, эстрогеноподобное действие.

При изготовлении полимерных изделий различного назначения (термобумага, контейнеры для пищевых продуктов и напитков, покрытия консервных банок, медицинские изделия, игрушки, упаковка и т.д.) производителями широко применяется в качестве пластификатора органическое синтетическое соединение – бис-

фенол А. Известно, что бисфенол А оказывает негативное воздействие на эндокринную и репродуктивную системы. Всемирная организация здравоохранения с его воздействием связывает развитие сердечно-сосудистых заболеваний, диабета, ожирения, раннего полового созревания, бесплодия, психоэмоциональных расстройств, рака молочной железы и простаты. Бисфенол А трудно заменить другим соединением с сохранением всех потребительских свойств готовых изделий. По результатам поиска альтернативного пластификатора производители стали использовать бисфенол S. Анализ литературных данных показал, что токсичность и опасность нового бисфенола недостаточно изучены. Особый научный интерес представляет сравнение токсических эффектов бисфенолов А и S, их специфичность и выраженность, что указывает на актуальность проведения соответствующих токсикологических экспериментов [1–4].

Цель исследования – оценка токсического действия бисфенолов А и S на экспериментальных моделях *in vitro* и *in vivo*.

Эксперименты проведены на 313 рандомбредных белых крысах массой 180–220 г, 62 морских свинках массой 338–392 г и 12 белых кроликах породы шиншилла массой 4,2–4,5 кг, содержащихся на стандартных кормах в виварии республиканского унитарного предприятия «Научно-практический центр гигиены», руководствуясь методическими документами (Инструкции по применению № 046-1215, 048-1215, 049-1215, 045-1215, 052-1215, 051-1215 утвержденные Главным государственным санитарным врачом Республики Беларусь).

Объектами исследований послужили бисфенол А, практически не растворим в воде, CAS № 80-05-7, молекулярный вес 228,29 г/моль, и бисфенол S, практически не растворим в воде, CAS № 80-09-1, молекулярный вес 250,27 г/моль производства Sigma-Aldrich Chemie N.V., Нидерланды.

При экспериментальном моделировании бисфенолы предварительно нагревали с раствором крахмала до получения крахмальной суспензии и в дальнейшем вводили лабораторным животным в соответствующих дозах. В качестве контроля использовали 1 % водный раствор крахмала.

Изучение особенностей токсических свойств при внутрижелудочном введении бисфенолов А и S проведено в остром эксперименте на крысах обоего пола. Острое отравление моделировали при воздействии максимально возможных объемов введения бисфенолов А и S с помощью иглы-зонда (интервалы между введениями 1,5 ч) с последующим наблюдением в течение 14 суток с регистрацией гибели опытных животных, клинических проявлений интоксикации, макроскопических изменений внутренних органов с оценкой их массовых коэффициентов, также учитывали прирост массы тела. Оценивали измерения систолического артериального давления (АДс), диастолического артериального давления (АДд) и частоты сердечных сокращений (ЧСС) до начала эксперимента, через 24 ч и через 14 дней после введения с помощью системы неинвазивного измерения кровяного давления грызунов «Систола» и платформы «Флогистон» (ООО «Нейроботикс», Россия). Декапитация животных проводилась через 24 ч с момента введения изучаемой дозы и через 14 дней после введения.

Определение степени опасности отравления при трансдермальном пути поступления проведено на крысах обоего пола путем однократного нанесения бисфенолов А и S в дозе 2500 мг/кг массы тела животного (втирания стеклянной палочкой) на предварительно выстриженные участки кожи спины.

Способность бисфенолов А и S к субхронической токсичности устанавливали при внутрижелудочном введении самкам и самцам белых крыс в дозах 240, 480 и 1920 мг/кг в течении 90-дневного опыта. В ходе эксперимента регистрировали изменения массы тела животных раз в неделю. После одномоментной декапитации крыс при аутопсии определены относительные коэффициенты массы (ОКМ) внутренних органов – щитовидной железы, желудка, надпочечников, печени, поджелудочной железы, почек, сердца, селезенки, тимуса, матки, яичников, семенников и придатков. Для характеристики функционального состояния организма опытных животных изучали морфофункциональный состав периферической крови (гематологический анализатор Mythic18, Швейцария), также определяли биохимические показатели сыворотки крови и мочи (автоматический биохимический анализатор Accent 200, Польша).

Сенсибилизирующую активность бисфенолов А и S изучали на самцах морских свинок в неадьювантном тесте Бюхлера. Исследование раздражающего действия бисфенолов на слизистые оболочки глаза кроликов и неповрежденные кожные покровы белых крыс проводили в соответствии с Инструкциями по применению № 049-1215 и 045-1215. Для выявления метаболических нарушений функции митохондрий бисфенолы исследовали *in vitro* в МТТ-тесте.

Результаты исследований обрабатывали общепринятыми методами вариационной статистики. Количественные параметры представлены в виде медианы и межквартильного размаха. При оценке различий между результатами опыта и показателями контроля использовали непараметрический *U*-критерий Манна – Уитни. Критическим уровнем значимости при проверке статистических гипотез был принят $p \leq 0,05$.

Обращение с животными при подготовке и проведении экспериментов осуществляли в соответствии с основными этическими принципами надлежащей лабораторной практики [5]. Дизайн исследований был одобрен на заседании комиссии по биоэтике республиканского унитарного предприятия «Научно-практический центр гигиены» № 1 от 04.03.2020.

Данное исследование выполнено в рамках гранта M20M-087 «Сравнительная токсикологическая оценка химических веществ группы бисфенолов с предполагаемым эстрогеноподобным действием» Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований.

При изучении токсических свойств бисфенолов при внутрижелудочном поступлении в период наблюдения после однократного воздействия не зарегистрировано проявлений интоксикации и гибели животных в контрольных и опытных группах. В пересчете на массу тела опытных животных (самцы и самки крыс) экспозиционная доза бисфенолов составила 5000 мг/кг, что является максимально возможной величиной для условий данного эксперимента. У опытных животных не наблюдалось клинических проявлений интоксикации, не регистрировались изменения цвета кожи и видимых слизистых оболочек. В соответствие с ГОСТ 12.1.007-76 бисфенолы А и S относятся к малоопасным соединениям – 4-й класс опасности. Однако при изучении функциональных показателей установлены статистически значимые нарушения ряда систем и органов.

Результаты измерений артериального давления показали, что поступление бисфенола А в организм белых крыс способствует снижению АДс и АДд на 27,3 и 22,3 % ($p < 0,05$) у самцов, а также на 6,2 и 23,6 % ($p < 0,05$) у самок соответственно. В то же время для бисфенола S подобных эффектов не обнаружено. ЧСС во всех опытных группах не отличалась от контрольных данных.

Анализ ОКМ внутренних органов через 14 суток после начала эксперимента показал, что в опытной группе самцов крыс введение бисфенола А привело к статистически значимому увеличению массы печени на 16,9 % и селезенки – 32,2 %, по сравнению с данными группы контроля. Также установлено токсическое действие бисфенола А на эндокринную систему самцов крыс, о чем свидетельствует увеличение ОКМ тимуса на 28,6 % при $p < 0,05$.

В опытных группах самок крыс, получавших бисфенолы А и S, не установлено изменений ОКМ почек, печени, тимуса, селезенки, сердца и надпочечников, как и у самцов, получавших бисфенол S. У всех опытных крыс прирост массы тела оставался на уровне контрольных животных.

При анализе биохимических показателей сыворотки крови самок белых крыс, получавших бисфенол А и S, установлено статистически значимое снижение холестерина на 20,0 и 20,0 %, аланиновой аминотрансферазы (АЛАТ) в 1,4 и 1,3 раза, аспарагиновой аминотрансферазы (АСАТ) – 1,5 и 1,3 раза соответственно – по отношению к контрольным значениям.

При изучении токсических свойств при однократном эпикутанном нанесении бисфенолов белым крысам на выстриженные участки кожи спины проявлений интоксикации и гибели животных в опытных группах не зарегистрировано, что позволило отнести изучаемые соединения к малоопасным соединениям (DL_{50} более 2500 мг/кг) – 4-й класс опасности.

На протяжении 90-дневного опыта при внутрижелудочном введении бисфенолов А и S у экспериментальных животных не наблюдали внешних проявлений интоксикации, также опытные группы белых крыс не отличались от контрольных по приросту массы тела, среднegrupповые значения которого колебались в пределах 87–101 г.

При воздействии бисфенола А в дозе 1920 мг/кг у самок установлено увеличение ОКМ щитовидной железы и почек, уменьшение ОКМ тимуса и яичников, у самцов выявлено увеличение ОКМ желудка, надпочечников, печени, селезенки и тимуса по отношению к контрольным животным при $p < 0,05$.

Введение бисфенола S в дозе 1920 мг/кг инициировало увеличения ОКМ печени, почек, селезенки и уменьшение ОКМ яичников у самок белых крыс, у самцов установлено статистически значимое увеличение ОКМ желудка, придатков и печени в 1,2 раза, селезенки и тимуса – в 1,3 раза при сравнении с данными контрольной группы.

При снижении вводимой дозы бисфенола А до 480 мг/кг у самцов обнаружено увеличение ОКМ желудка, надпочечников, печени и селезенки, у самок – увеличение ОКМ щитовидной железы. При воздействии бисфенола S на самцов крыс в дозе 480 мг/кг выявлено увеличение ОКМ печени, селезенки, тимуса и уменьшение ОКМ надпочечников, у самок – увеличение ОКМ почек.

Изучение морфофункциональных показателей периферической крови самцов белых крыс, подвергнутых субхроническому воздействию бисфенола А в дозе 1920 мг/кг, показало снижение показателя гетерогенности тромбоцитов и увеличение лейкоцитов, моноцитов, лимфоцитов, тромбоцитов и показателя тромбокрита, в то время как у самок наблюдалось увеличение количества тромбоцитов. При уменьшении дозы бисфенола А до 480 мг/кг установлено статистически значимое увеличение лейкоцитов и лимфоцитов только у самцов экспериментальных животных. Экспозиция бисфенола S в дозе 1920 мг/кг инициировала увеличение

лейкоцитов, лимфоцитов, тромбоцитов, тромбокрита и показателя гетерогенности тромбоцитов при $p < 0,05$. При снижении вводимой дозы бисфенола S до 480 мг/кг у самцов белых крыс также выявлено статистически значимое увеличение лейкоцитов, лимфоцитов, тромбоцитов, тромбокрита и показателя гетерогенности тромбоцитов.

При изучении биохимических показателей сыворотки крови самцов белых крыс, получавших бисфенол A в дозе 1920 мг/кг, установлено снижение общего билирубина, глюкозы, холестерина, магния, железа, АСАТ и лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и увеличение содержания общего белка ($p < 0,05$). При этом у самок, получавших такую же дозу бисфенола A, выявлено статистически значимое снижение активности ЛДГ и увеличение содержания креатинина и общего белка. Введение дозы 480 мг/кг самцам белых крыс способствовало снижению общего билирубина, магния, холестерина, АСАТ и ЛДГ и увеличению содержания общего белка в крови. У самок белых крыс при том же уровне воздействия установлено снижение активности ЛДГ и увеличение содержания креатинина и общего белка.

При анализе биохимического статуса самцов белых крыс после воздействия бисфенола S в дозе 1920 мг/кг выявлено статистически значимое снижение магния, АЛАТ, АСАТ и ЛДГ и увеличение содержания общего белка, мочевины, холестерина, креатинина. При этом у самок, получавших такую же дозу бисфенола S, установлено снижение активности ЛДГ и магния и увеличение содержания глюкозы, мочевины, креатинина, общего белка. При внутрижелудочном введении дозы 480 мг/кг самцам белых крыс выявлено снижение магния и ЛДГ и увеличение содержания мочевины, креатинина. У самок белых крыс аналогичная доза инициировала статистически значимое снижение активности ЛДГ и магния, увеличение содержания глюкозы, мочевины, креатинина.

Со стороны функциональных показателей состояния мочевыводящей системы на 90-е сутки эксперимента статистически значимое увеличение суточного диуреза наблюдалось во всех опытных группах. Доза бисфенола A 1920 мг/кг способствовала повышению в моче у самцов белых крыс уровней креатинина, глюкозы и магния, а также снижению содержания фосфора. У самок белых крыс введение максимальной дозы бисфенола A инициировало увеличение содержания глюкозы и фосфора и снижало уровни общего белка, мочевины и креатинина. В то же время у опытных групп самцов, которым вводили бисфенол S в дозе 1920 мг/кг, в моче наблюдалось снижение уровня креатинина и общего белка, увеличение содержания глюкозы, фосфора, магния и мочевины. В опытных группах самцов и самок, которым вводили бисфенол A в дозе 480 мг/кг, установлены статистически значимые изменения показателей состояния мочевыделительной системы: у самцов увеличение уровней глюкозы и магния, уменьшение содержания фосфора и общего белка; у самок повышение уровней глюкозы и фосфора, снижение содержания общего белка. У самцов и самок, получавших бисфенол S в аналогичной дозе, выявлены нарушения функционального состояния почек: у самцов уменьшение уровней креатинина, фосфора и общего белка, увеличение уровней магния, глюкозы и мочевины; у самок снижение уровней креатинина, мочевины, общего белка, магния и фосфора и повышение уровня глюкозы при $p < 0,05$. При введении дозы 240 мг/кг бисфенолов A и S изменений изученных показателей не выявлено.

После проведения провокационной экспозиции ни у одной из опытных морских свинок, подвергнутых воздействию бисфенолов А и S, не было отмечено положительного ответа кожи, свидетельствующего о сенсибилизации, что указывает на отсутствие сенсибилизирующего действия бисфенолов в тесте Бюхлера.

При изучении местно-раздражающего действия бисфенолов А и S признаки гиперемии и визуально значимые изменения статуса кожных покровов опытных животных не выявлены. Суммарная количественная оценка степени индукции эритемы и отека для контроля и опыта при воздействии бисфенолов А и S составляет по 0 баллов. Следовательно, бисфенолы не способны к индукции выраженных раздражающих свойств кожи.

После введения бисфенолов А и S в нижний конъюнктивальный свод правого глаза кроликов выявлены признаки раздражения в виде покраснения конъюнктивы, которые исчезли на 5-й день эксперимента. На основании полученных результатов можно сделать вывод, что бисфенолы оказывают умеренное раздражающее действие.

При изучении эстрогеноподобного действия бисфенолов на культурах клеток MCF-7 в МТТ-тесте *in vitro* установлено значительное индуцирование пролиферации клеток, по сравнению с контрольными данными. Бисфенол А проявлял эстрогеноподобную активность в диапазоне концентраций $1 \cdot 10^{-7}$ – $1 \cdot 10^{-5}$ моль/л, увеличивая пролиферацию клеток на 25–39 %, бисфенол S – $1 \cdot 10^{-7}$ – $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л, обладал цитотоксическим действием, эстрогеноподобной активности не выявлено.

Таким образом, экспериментально установленные данные о токсических свойствах бисфенолов А и S при однократном внутрижелудочном введении и накожном нанесении свидетельствуют, что бисфенолы относятся к малоопасным соединениям (4-й класс опасности). Однако статистически значимое изменение ряда клинико-лабораторных показателей свидетельствует о более выраженном токсическом действии бисфенола А для самцов белых крыс, а также наличии эндокринных нарушений и гипотензивного действия при сравнении с токсическим действием бисфенола S.

При субхронической экспозиции бисфенолов А и S при пероральном введении самкам и самцам белых крыс в дозах 1920, 480 и 240 мг/кг на протяжении эксперимента гибели животных и внешних проявлений интоксикации не установлено, прирост массы тела опытных животных не отличался от контрольных данных. При воздействии бисфенола А в дозах 1920 и 480 мг/кг выявлено изменение относительных коэффициентов массы внутренних органов, в том числе эндокринной системы: печени, селезенки, щитовидной железы, почек, надпочечников и тимуса. Воздействие бисфенолами А и S характеризовалось гепато- и нефротоксичностью, на что указывало снижение билирубина, холестерина, железа, АСАТ, АЛАТ, креатинина; кроме того, снижение уровня ЛДГ указывает на вовлечение в патологический процесс сердца. Изучение содержания микроэлементов сыворотки крови обнаружило наличие сдвигов минерального обмена магния и железа, существенное понижение последнего, вероятно, являлось причиной снижения ряда показателей красного кровяного ростка. Состояние мочевыделительной системы опытных крыс в целом характеризовалось множественными изменениями уровней метаболитов на фоне увеличения суточного диуреза.

В стандартных условиях моделирования на лабораторных животных бисфенолы А и S оказывали умеренное раздражающее действие, не вызывали формирование аллергических реакций и признаков раздражения при контакте с неповрежденными кожными покровами.

Бисфенол А проявлял эстрогеноподобную активность в МТТ-тесте *in vitro*, увеличивая пролиферацию клеток MCF-7 на 25-39 %. Бисфенол S не оказывал эстрогеноподобного действия на фоне выраженных цитотоксических свойств.

Список литературы

1. Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs. European Food Safety Authority (EFSA) Panel on Food Contact Materials, Enzymes, Flavourings Processing Aids (CEF) [Электронный ресурс]. – URL: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.2903/j.efsa.2015.3978> (дата обращения: 01.08.2023).
2. Bansal R., Zoeller R.T. CLARITY-BPA: Bisphenol A or Propylthiouracil on Thyroid Function and Effects in the Developing Male and Female Rat Brain // *Endocrinology*. – 2019. – Vol. 160, № 8. – P. 1771–1785.
3. Грынчак В.А., Сычик С.И. Особенности токсического действия диизононилфталата и его регламентирование в полимерных материалах и изделиях медицинского назначения // *Анализ риска здоровью*. – 2020. – № 1. – С. 118–125. DOI: 10.21668/health.risk/2020.1.13
4. Научное обоснование гигиенических регламентов содержания пиколинафена в среде обитания человека / В.А. Грынчак, И.И. Ильюкова, С.И. Сычик // *Токсикол. вестн.* – 2019. – № 6. – С. 50–55. DOI: 10.36946/0869-7922-2019-6-50-55
5. Надлежащая лабораторная практика: ТКП 125-2008 (02040). – Введ. 01.05.2008. – Минск: РУП «Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении», 2008. – 40 с.

Оценка влияния препарата, содержащего пираклостробин и ципроконазол, на некоторые гематологические, биохимические и морфометрические показатели белых крыс, полученные в подостром эксперименте

Л.Г. Лаппо, В.И. Иода, Е.С. Юркевич

Научно-исследовательский институт гигиены, токсикологии, эпидемиологии, вирусологии и микробиологии государственного учреждения «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья», г. Минск, Республика Беларусь

Представлены результаты исследования биохимических показателей сыворотки крови и мочевыделительной системы, морфометрических показателей белых крыс при 30-кратном внутрижелудочном введении препарата на основании пираклостробина и ципроконазола. Полученные данные свидетельствуют о влиянии препарата, введенного *per os*