

РОЛЬ БИМОДЕЛИРОВАНИЯ В ОЦЕНКЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ НА ОРГАНИЗМ ЧЕЛОВЕКА

Соседова Л.М.

ФГБУН Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований,

Ангарск, Россия, 665827, 12а микрорайон, д. 3,

Тел.8(3955)55-40-79, e-mail: sosedlar@mail.ru

Резюме: 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, токсической энцефалопатии, изучении сочетанного действия факторов биологической и химической природы. 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, биологический, химический фактор.

THE ROLE OF BIOMODELING IN EVALUATING THE IMPACT OF CHEMICAL ENVIRONMENTAL FACTORS ON ORGANISM OF MAN

Sosedova L.M.

FSBSU Eastern-Siberian Institution of Medical and Ecological Research, Angarsk, Russia,

665827, 12a mikroregion, 3,

Tel. 8(3955)55-40-79, e-mail: sosedlar@mail.ru

Abstract: Features of the methodological approaches in the experimental research on the impact of environmental factors on the human organism were showed in this materials. results self constructed experiments, modeling of biological effects of antimicrobial nanobiocomposites with nanosilver particles, toxic encephalopathy, studying of combined effect of factors of biological and chemical nature. the significance of intracellular proteomics in assessing the effects of nanoparticles and nanomaterials on body was proved. Some of growing flow key links

of mercury intoxication in remote period are identified . Proven encumbering role of prenatal hypoxia in development of intoxication in mature rats.

Key words: modeling, laboratory animals, toxic encephalopathy, offspring of white rats, prenatal hypoxia white rats, nanobiocomposites, biological, chemical factor

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 760 самцов и 250 самок белых крыс и 380 морских свинок. Экспериментальных животных содержали в специальном помещении с 12 часовым светлым/тёмным циклом, регулируемой 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 Минздравсоцразвития 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.

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 биокомпозита наносеребра (размер наночастиц 10-12нм, содержание серебра - 16,73%) в дозе 100 мкг/кг массы. 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 лень 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 150ppm.

Сочетанное воздействие биологического и химического факторов проводили путем сенсibilизации морских свинок белоксодержащей пылью (БСП) микробиологического производства и диоксидом серы в разных сочетаниях и последовательностях. БСП

вводили морским свинкам по 500 мкг в смеси с неполным адъювантом Фрейнда под апоневроз задней лапки. Обязательным условием являлось создание у морских свинок низкодозной-НДТ или высокодозной-ВДТ толерантностей, индукцию которых вызывали по методике, предложенной Л.А. Дуевой, О.Г. Алексеевой, Т.И. Гришиной [4]. Ингаляционную затравку диоксидом серы осуществляли, помещая морских свинок в затравочные камеры на 4 часа в течение 10 дней. Концентрации диоксида серы (2-4 мг/м³), температура и влажность поддерживались на одном уровне. Ингаляционную экспозицию диоксидом серы проводили за 14 дней, или через 14 дней, или одновременно с сенсибилизирующими инъекциями БСП.

Обследование животных осуществляли классическими методами, принятыми в токсико-гигиенических исследованиях, включающими биохимический, аллергологический, поведенческий, электронейрографический, гистологический, морфометрический анализ [5], 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 2011г. Статистическую обработку 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 нейропилия. Ультраструктурный анализ нейронов коры головного мозга выявил в гистологических препаратах животных деформацию ядер нейронов. Результаты проведенных экспериментальных исследований показали, что наносеребро, инкапсулированное в полимерную матрицу, при подостром введении в организм животных способно индуцировать в нейронах коры головного мозга запуск апоптотического каскада, нарастающего с течением времени. Показано, что в нейронах коры головного мозга происходит резкая активация проапоптотического белка caspase 3, приводящая к программированной смерти клетки. Активности в нейронах антиапоптотического белка bcl-2 не хватает для предотвращения апоптоза и формирования внутриклеточных защитных механизмов [6,7]. Таким образом, по нашему мнению, оценка эффекта действия наночастиц и нанокompозитов на организм должна проводиться на основании результатов ультрамикроскопических исследований клеток-мишеней (электронно-микроскопическая, конфокальная микроскопия, внутриклеточная протеомика, метаболомика с использованием различных меток) и в течение длительного периода наблюдений.

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 [8]. 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 отёка и стаза сосудов; изменение экспрессии нейроспецифических белков.

Актуальность исследований отдаленных последствий воздействия химических 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. Показано, что в первую очередь у потомства первого и второго поколений возникают нарушения со стороны центральной нервной системы с формированием изменений поведения животных, физического развития и морфологии ткани головного мозга [9]. 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 нейрофизиологическими 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 [10].

Проведенное в Институте экспериментальное моделирование сочетанного действия белоксодержащей пыли микробиологического производства и диоксида серы позволило разработать методологические основы изучения сочетанного действия факторов биологической и химической природы. Биомоделирование позволяет выстроить логическую схему проведения экспериментов, подчиненных основной цели выявления закономерностей биологических процессов, протекающих в организме животных [11]. При этом экспериментальное моделирование упрощает рассуждения, а принцип интегральной оценки ответной реакции облегчает понимание сущности получаемых явлений. Предложенные нами методологические подходы к постановке исследований по экспериментальному изучению сочетанного действия биологического и химического факторов включают несколько принципиально значимых моментов:

- обязательным условием при постановке эксперимента является создание трех исходных базовых моделей (сенсibilизация, НДТ, ВДТ), формирующихся при воздействии биологического фактора любой природы;
- введение химического вещества необходимо проводить соответственно при каждом состоянии в трех последовательностях: до, после и одновременно с введением БСП, что позволит выявить наиболее неблагоприятную последовательность сочетания биологического и химического факторов;
- для понимания сущности ответных реакций организма предлагаем сжать полученную информацию посредством обобщенных показателей, облегчающих оценку состояния организма животных сравниваемых групп и анализировать изменения гомеостаза не по отдельным параметрам или системам, а использовать принцип «доза-статус организма», позволяющий всю сумму развившихся эффектов оценивать как единое целое.

Заключение

Учитывая возрастающее биологическое загрязнение атмосферного воздуха населенных мест, считаем, что предложенные методические подходы будут являться актуальными и лежать в основе биомоделирования при изучении сочетанного действия различных биологических и химических факторов. Отсутствие в настоящее время мониторинга за суммарным биологическим загрязнением атмосферного воздуха, в том числе и в районах размещения биотехнологических производств с высоким потенциальным риском такого загрязнения, не дает возможности прогнозирования и расчета риска неблагоприятных ситуаций, связанных с массовыми случаями острых токсико-аллергических заболеваний.

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 персонифицированной медицине начинается с трансляции результатов эксперимента на организм человека. В то же время обоснование персонифицированных 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 / Н.Н. Каркищенко. – М.: Изд-во ВПК, 2004.-342с.
2. Shurygina, I. A. 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 et. al.// 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. Диева, Л.А. Вопросы адаптации и дезадаптации иммунной системы организма при воздействии промышленных химических аллергенов / Л.А. Диева, О.Г.Алексеева, Т.И. Гришина // Гигиена труда и профессиональные заболевания. – 1982. – № 4. – С. 8-12.
5. Общая токсикология / Под ред. Б. А. Курляндского, В. А. Филова. М.: Медицина, 2002.-579с.
6. Титов, Е.А. Экспрессия bcl-2 как критериальный показатель воздействия нанобиокмполитов / Е.А.Титов, М.А. Новиков // [Токсикологический вестник](#). – 2014. – № 4. - С. 34-38.
7. Новиков, М.А. Реакция белых крыс при внутрижелудочном введении вновь синтезированного нанобиокполита на основе частиц Ag(0) и арабиногалактана / М.А.Новиков и др. // Химико-фармацевтический журнал. – 2014. –№ 6. –С.34-39.
8. Соседова, Л.М. Научно-методические основы моделирования ртутной токсической энцефалопатии / Л.М. Соседова // Токсикологический вестник. – 2010. – №1.- С. 21-25.
9. Капустина, Е.А. Развитие потомства самцов и самок аутбредны крыс, подвергавшихся воздействию сулемы / Е.А.Капустина // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2013. – №1(89). – С. 102-105.
10. Вокина, В.А. Нейротоксический эффект толуола на фоне пренатального гипоксического повреждения головного мозга белых крыс / В.А. Вокина и др. // Медицина труда и промышленная экология. – 2014. – №4. – С. 30 - 34.
11. Рукавишников, В.С. Методологические аспекты оценки сочетанного действия биологического и химического факторов / В.С. Рукавишников, Л.М. Соседова // Медицина труда и промышленная экология. – 2006. – № 9. –С. 23-27.