

Способ ранней диагностики патологических состояний в условиях воздействия на организм физиологически активных веществ, обладающих генотоксическими свойствами

О.М. Антонова

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«33 Центральный научно-исследовательский испытательный институт»
Министерства обороны Российской Федерации, 412918, Российская Федерация,
Саратовская обл., г. Вольск-18, ул. Краснознаменная, д. 1

Поступила 14.12.2016 г. Принята к публикации 02.03.2017 г.

Разработан способ ранней диагностики патологических состояний в условиях воздействия на организм физиологически активных веществ (ФАВ), обладающих генотоксическими свойствами. Способ заключается в оценке микросомальной системы печени при действии ксенобиотиков алкилирующего типа и состояния системы микросомального окисления *in vivo*. Предлагается предварительно оценивать норму реакции организма (фенотип биообъекта) по интенсивности микросомального окисления при изучении токсикологических характеристик ФАВ, воздействующих на организм в дозах низкой интенсивности. Способ включает характеристику наследственно обусловленной интенсивности эпоксилирующих (гидроксилирующих) реакций метаболизма с использованием карбамазепина в качестве фармакологического зонда. Сформулированы определения понятий нормы, порога вредного действия и предпатологических состояний организма с позиции детоксикации ксенобиотиков.

Ключевые слова: индивидуальные различия; гетерогенность популяции; фенотип; фармакокинетика карбамазепина; ксенобиотики алкилирующего типа.

Библиографическое описание: Антонова О.М. Способ ранней диагностики патологических состояний в условиях воздействия на организм физиологически активных веществ, обладающих генотоксическими свойствами // Вестник войск РХБ защиты. 2017. Т. 1. № 1. С. 15–22.

Физиологически активные вещества (ФАВ) различного происхождения способны вызывать патологические процессы в организме человека, трудно поддающиеся своевременному распознаванию существующими методами клинической диагностики. Затрудняет установление факта поражения ФАВ наличие популяционных различий в генотипах людей, приводящих к различным, иногда противоположным ответам биохимических и физиологических систем человека на такое воздействие [1–3].

Цель настоящей работы – разработать способ ранней диагностики патологических состо-

яний человека, вызванных воздействием ФАВ, обладающих генотоксическими свойствами.

Материалы и методы

Оценить факт воздействия ФАВ и их последствий на организм человека возможно, используя метод фенотипирования, в частности, метод фармакологического зондирования. Суть метода заключается в разделении популяции на группы (фенотипы) по значениям фармакокинетических параметров хорошо изученного лекарственного препарата (фармакологического зонда) при воздействии на организм в эквивалентной дозе, характеризующей

физиологическую норму организма. Фармакокинетические параметры фармакологического зонда отражают интенсивность элиминации препарата и косвенно характеризуют активность ферментов, участвующих в его метаболизме, как в норме, так и после воздействия на организм ФАВ, метаболизм которого протекает с участием тех же ферментных систем.

При изучении формирования адаптационно-компенсаторных метаболических реакций использовали клинически здоровых белых нелинейных крыс, имеющих сходные с человеком качественные характеристики изоферментов цитохрома P-450 [3].

В качестве ФАВ, обладающих генотоксическими свойствами, использовали сернистый иприт и радиоизотоп урана-238 (биомаркеры воздействия). Мишенью данных генотоксикантов являются митохондриальные ДНК, непосредственно близкие к дыхательной цепи, участвующие в экспрессии генов по инициации активных форм кислорода [4]. В качестве фармзонда использовали карбамазепин (биомаркер эффекта), биотрансформация которого проходит с образованием эпоксиформ [5]. Карбамазепин – ГАМК-миметик, трансформируется монооксигеназной системой по эпоксиддиольному пути и относится к лекарственным противосудорожным средствам. Иприт вводили внутривенно в дозе $0,1 \text{ LD}_{50}$ (0,15 мг/кг), радиоизотоп урана-238 – внутримышечно в эквивалентной дозе ($0,1 \text{ LD}_{50} = 0,0012 \text{ мКи/кг}$). Дозы $0,1 \text{ LD}_{50}$ исследуемых веществ определяются в области пороговых значений.

Эксперимент проводили в условиях *in vivo*. Для установления нормы реакции у животных определяли фармакокинетические параметры карбамазепина при его пероральном введении в дозе 25 мг/кг в 1 % водном растворе крахмала в объеме 10 мл/кг. Всего обследовано 200 животных, из которых выделено по девять особей с быстрым и медленным метаболизмом карбамазепина. Разграничение особей на различные фенотипы, характеризующие интенсивность элиминации карбамазепина по эпоксиддиольному пути, осуществляли по достоверно отличающимся расчетным значениям фармакокинетических параметров препарата, найденным по его концентрации в плазме крови исследуемых биообъектов.

На рисунках 1, 2 показаны значения нормы клиренса карбамазепина для особей с быстрым и медленным типами эпоксидирования. Клиренс обоснован в качестве основного показателя, характеризующего скорость удаления вещества из организма, который в данном случае отражает интенсивность процессов эпоксидирования карбамазепина. По истечении двух недель выделенных особей

каждого фенотипа подвергали воздействию генотоксикантом и определяли фармакокинетические параметры карбамазепина при его повторном введении в разные сроки интоксикации в течение двух месяцев. Кровь у крыс забирали из подъязычной вены на 1, 3, 7, 14, 30 и 60 сут. Предварительно показано, что в контрольной группе животных отсутствуют значимые различия фармакокинетических параметров карбамазепина в установленные сроки наблюдения [3].

Пробоподготовку осуществляли путем отбора в пробирки по 1 мл плазмы крови. Плазму подкисляли добавлением 50 мкл 6 М HCl. Затем небольшими порциями в течение 30 с приливали 8 мл хлороформа, после чего добавляли 60 мг аммония сернокислого. Каждое добавление реактивов сопровождалось интенсивным перемешиванием проб. Полученные таким образом пробы центрифугировали 10 мин при 3000 об./мин. Затем 6 мл супернатанта отбирали в чистые пробирки и выпаривали потоком воздуха до сухого остатка при 42 °С. После чего в пробирки добавляли по 100 мкл метилового спирта, встряхивали в течение 30 с и проводили хроматографический анализ полученного раствора.

Концентрацию фармзонда определяли в плазме крови крыс с помощью жидкостной обращенно-фазовой хроматографии. Оптимизацию параметров хроматографического разделения карбамазепина проводили на колонках Zorbax SB-C18 (4,6 × 250 мм, 5 мкм) на высокоэффективном жидкостном хроматографе (ВЭЖХ) Agilent HP 1100 фирмы «Hewlett Packard» (США). Идентификацию карбамазепина осуществляли при $\lambda = 290 \text{ нм}$ и подвижной фазе метанол-вода в соотношении 70:30 объемных единиц. Скорость потока подвижной фазы составила 1 мл/мин. Преимуществом ВЭЖХ является высокая чувствительность и селективность определяемых соединений в биологических средах организма.

Математическую обработку результатов по расчету интегральных модельно-независимых фармакокинетических параметров производили с использованием метода статистических моментов [6]. Основным достоинством модельно-независимого метода статистических моментов является его объективность, получаемые оценки параметров в минимальной степени зависят от субъективных факторов.

Результаты и обсуждение

Результаты исследований, полученные при оценке фармако-, токсикокинетических характеристик ФАВ в организме, учитывающие генотип биообъекта, являются ключевыми по поиску биомаркеров токсического воздействия и эффекта, что способствует раз-

работке способов донозологической диагностики патологических состояний организма. Данный постулат основан на современных представлениях инициации механизма токсичности ФАВ, состоящий из трех этапов [7]. Первый этап характеризуется воздействием вещества или активных форм метаболитов (биомаркер воздействия) на организм и инициацией экспрессии генов. Второй этап определяется генетическим кодом организма и экспрессией сигналов, путем транскрипции матричной РНК (мРНК) с кодирующего участка ДНК (кДНК). На данном этапе определяется состав протеома (белковых молекул). Третий этап характеризуется установлением каталитических факторов метаболизма про-

теома. Осуществляется синтез *de novo* необходимых белков или биологических структур, в том числе рецепторных (биомаркеры эффекта). Регуляция взаимодействий циклична, так как вещество воздействует на геном, иницируя экспрессию генов, а метаболитом регулирует геном через генную транскрипцию посредством специальных белково-метаболических взаимодействий. Учитывая основные этапы в инициации механизма токсичности ФАВ, нами разработан способ определения состояния системы микросомального окисления *in vivo*, включая характеристику наследственно обусловленной интенсивности эпоксилирующих реакций метаболизма (образование метаболитов с промежуточными эпоксифор-

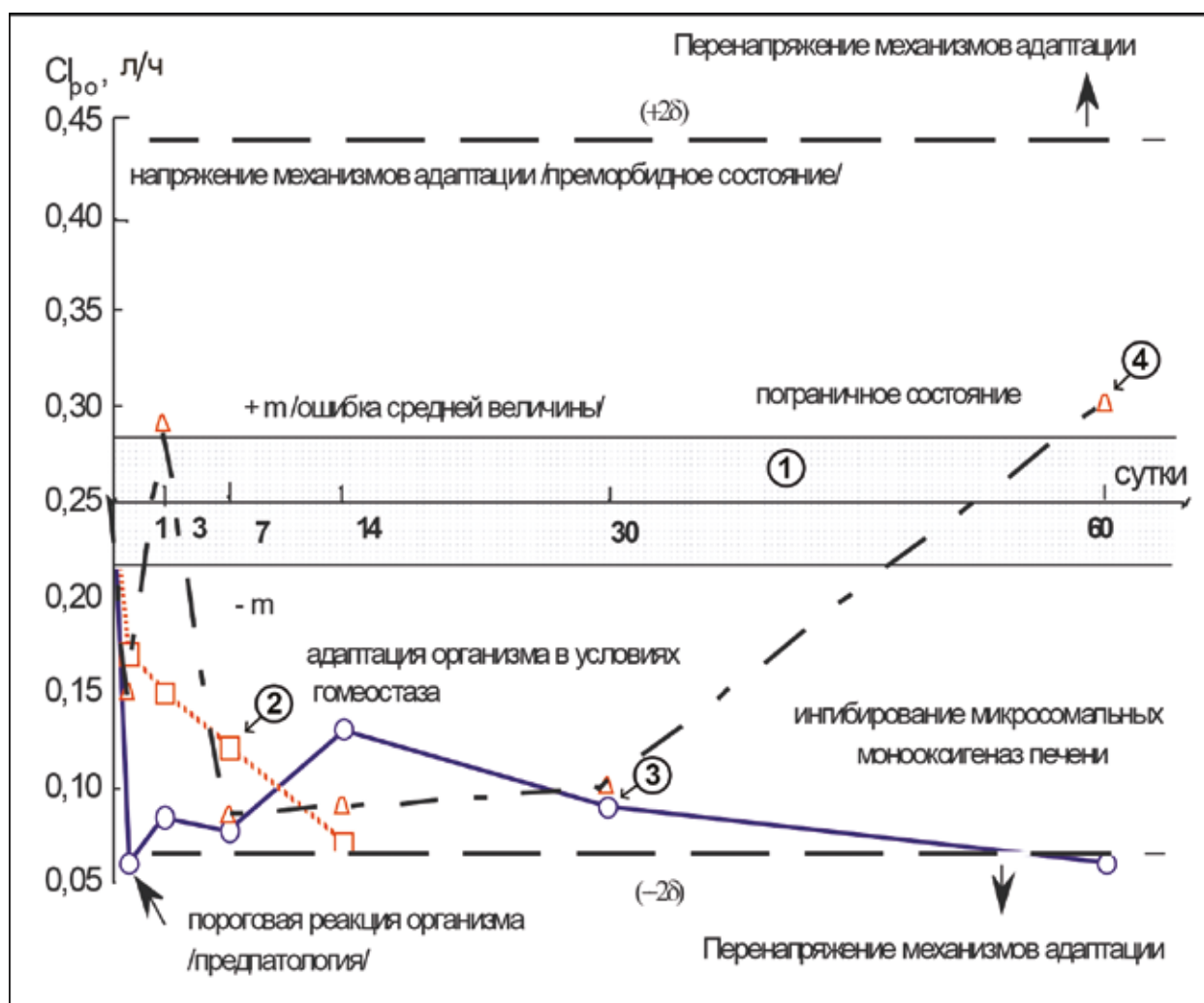


Рисунок 1 — Влияние иприта и радиоизотопа урана-238 на величину клиренса карбамазепина у крыс с быстрым типом эпексидирования

(1 — контрольное значение клиренса карбамазепина и его стандартная ошибка ($0,25 \pm 0,032$), количество животных — 9; 2 — величина клиренса карбамазепина после внутримышечного введения крысам радиоизотопа урана-238 в дозе $0,1 LD_{50}$; 3 — величина клиренса карбамазепина после внутривенного введения крысам иприта в дозе $0,1 LD_{50}$; 4 — величина клиренса карбамазепина после комбинированного действия на организм крыс иприта и радиоизотопа урана-238 в эквиволярных дозах)

мами) [8]. Основные результаты теста представлены на рисунках 1, 2. Анализ данных, представленных графически на рисунках 1, 2, свидетельствует о разнонаправленном изменении показателя клиренса карбамазепина при однократном действии на организм крыс иприта или радиоизотопа урана-238 в дозах $0,1 LD_{50}$. Для крыс с быстрым типом эпоксидирования характерно ингибирование микросомальных монооксигеназ печени крыс, тогда как для животных с медленным фенотипом – активация. Активация микросомальных монооксигеназ печени для особей с медленным типом эпоксидирования (медленным фенотипом метаболизма) характеризует значение параметра клиренса, вышедшее

за рамки величины $+2\delta$, что свидетельствует о перенапряжении механизмов адаптации в первые трое суток. К тридцатым суткам интоксикации интенсивность реакций детоксикации для этой группы животных приходит в норму. Для особей с быстрым типом эпоксидирования (быстрым фенотипом метаболизма) характерен более длительный период адаптации на протяжении всего периода наблюдения. Для данной группы животных при внутривенном введении иприта значения клиренса карбамазепина практически совпадают с величинами, отражающими достоверные границы -2δ , что свидетельствует о напряжении механизмов адаптации. Очевидно, для особей с медленным типом эпоксидиро-

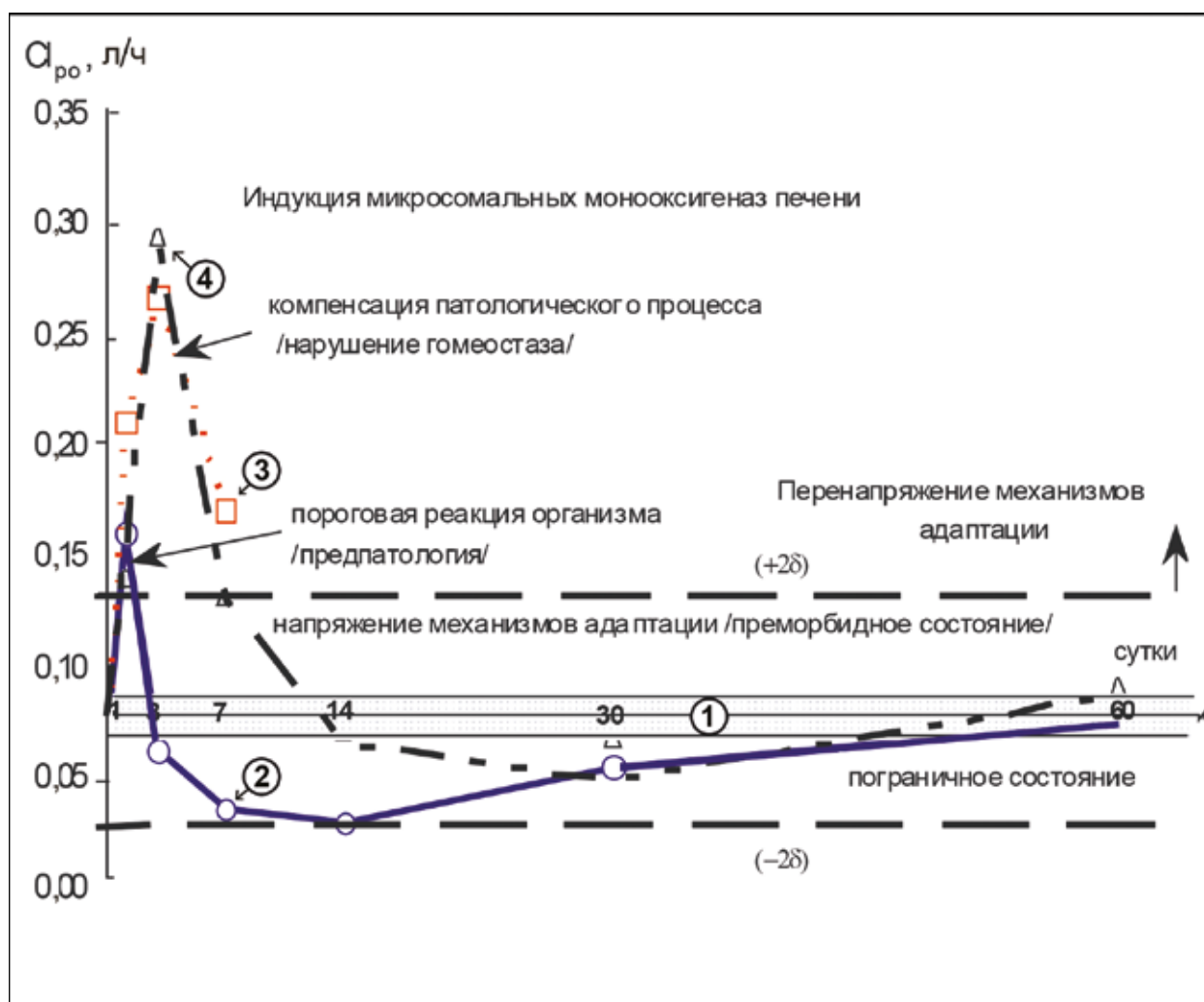


Рисунок 2 — Влияние иприта и радиоизотопа урана-238 на величину клиренса карбамазепина у крыс с медленным типом эпоксидирования

(1 — контрольное значение клиренса карбамазепина и его стандартная ошибка ($0,078 \pm 0,0088$), количество животных – 9; 2 — величина клиренса карбамазепина после внутривенного введения крысам иприта в дозе $0,1 LD_{50}$; 3 — величина клиренса карбамазепина после внутримышечного введения крысам радиоизотопа урана-238 в дозе $0,1 LD_{50}$; 4 — величина клиренса карбамазепина после комбинированного действия на организм крыс иприта и радиоизотопа урана-238 в эквимоларных дозах)

вания адаптационные возможности организма лежат в более узком диапазоне, при условии, когда токсическое действие в большей степени зависит от исходных веществ, а не вновь образующихся активных форм метаболитов.

Адаптационно-компенсаторные реакции организма, характеризующие быстрый и медленный типы элиминации карбамазепина, реагируют на воздействие радиоизотопа урана-238 сходным образом, как при воздействии иприта. Необходимо особо подчеркнуть, что к третьим суткам интоксикации особи с медленным типом эпексидирования после воздействия радиоизотопа урана-238 имеют значения фармакокинетических параметров карбамазепина, характерные для особей с быстрым типом метаболизма в норме. Тогда как интенсивность метаболизма монооксигеназной системы для особей с быстрым фенотипом снижается и приближается к нормальным значениям, характерным для особей с медленным фенотипом. Таким образом, без разделения особей на фенотипы факт воздействия урана-238 в области пороговой дозы ($0,1 LD_{50}$) к третьим суткам интоксикации не обнаруживается.

Комбинированное действие иприта и радиоизотопа урана-238 существенным образом не отличается от отклика ферментов монооксигеназной системы по интенсивности микро-

сомального эпексидирования карбамазепина при раздельном воздействии химического и физического факторов. Очевидно, активность и содержание ферментов печени, участвующих в детоксикации исследуемых веществ, достаточна для адаптации монооксигеназной системы и не приводит к существенному изменению адаптационно-компенсаторных реакций организма при комбинированном воздействии химического и физического факторов.

Анализ представленных данных свидетельствует, что разработанный способ позволяет увеличить точность и чувствительность ранней диагностики параметров функционирования жизненно важных систем организма человека в условиях *in vivo* путем установления популяционной чувствительности к воздействию веществу по фармакокинетике фармакологического зонда. Практическая ценность полученных результатов заключается в том, что предварительное популяционное деление на фенотипы позволяет выявить именно 5 % особей, у которых значения показателей нормы выходят за пределы референт-диапазона. Такой подход особенно важен в связи с тем, что рекомендуемые санитарные стандарты исходно рассчитаны не на всю популяцию. Пять процентов населения в условиях соблюдения ПДК могут оказаться пораженными, в связи с тем, что изначально-

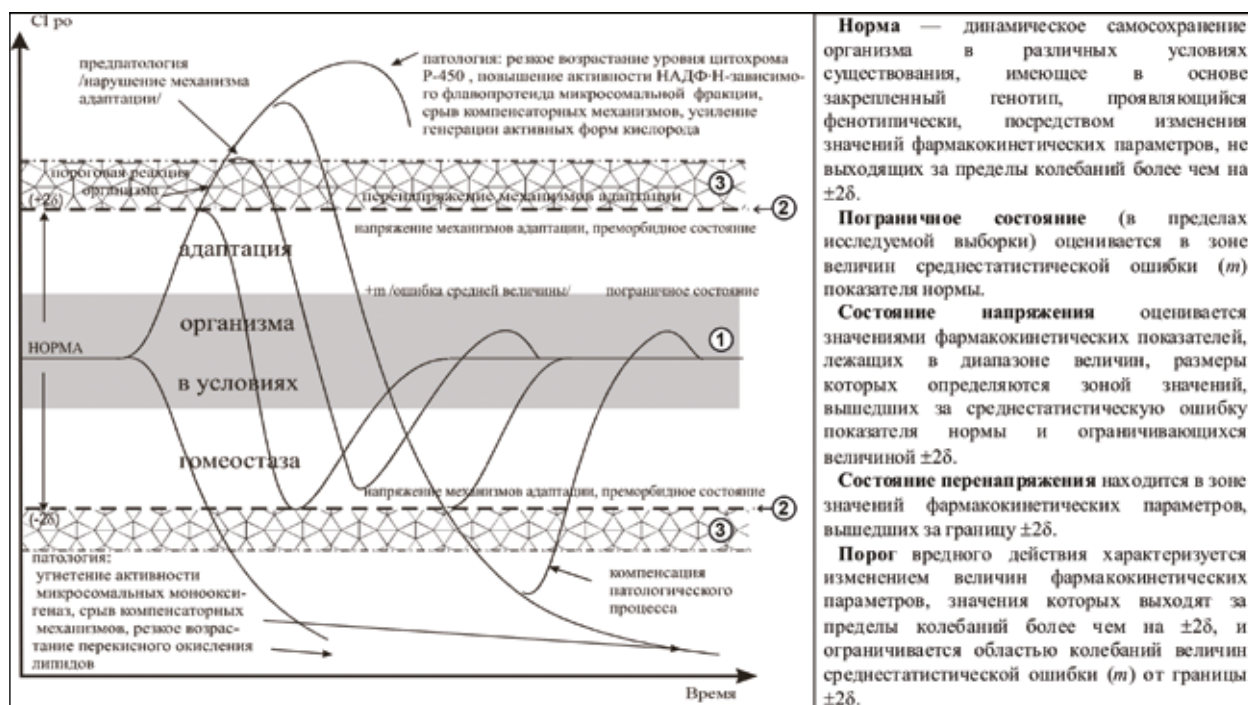


Рисунок 3 — Определение понятий нормы, порога вредного действия и предпатологических состояний организма с позиции детоксикации ксенобиотиков

(1 — контрольные значения клиренса и его стандартная ошибка ($M \pm m$); 2 — граница стандартного отклонения ($\pm 2\sigma$); 3 — величина стандартной ошибки клиренса при пороговой реакции организма)

но закладывается достоверность выводов, равная 95 % ($\pm 2\delta$). В настоящее время стандартное отклонение предлагается увеличить до $\pm 3\delta$ [9]. Однако даже при таком подходе существуют люди с показателями нормы, попадающие в группу повышенного риска из-за особенностей онтогенеза.

Результатом проведенных исследований является иллюстрация наиболее важных возможных механизмов при формировании адаптационно-компенсаторных реакций организма (рисунок 3). На основании проведенного анализа литературных источников об общепризнанных представлениях функционирования организма в норме [10, 11], а также собственных экспериментальных исследований предлагаем использовать понятие нормы и определения адаптационно-компенсаторных состояний организма с позиции детоксикации ксенобиотиков (рисунок 3) [8].

Выводы

1. Разработан способ определения состояния системы митохондриального окисления *in vivo*, позволяющий повысить чувствительность и специфичность методов ранней диагностики патологических состояний биообъекта в условиях воздействия на организм ФАВ, обладающих генотоксическими свойствами.

2. Установлено, что крайние значения фармакокинетических показателей фармзонда (карбамазепина), попадающие в 5 %-ный диапазон нормы, по-разному отвечают на воз-

действие вредного фактора. Для одной группы биообъектов (медленный фенотип метаболизма веществ по эпоксиддиольному пути) после воздействия иприта и радиоизотопа урана-238 в дозах в области пороговых значений ($0,1 LD_{50}$) происходит активация процессов адаптации по значениям клиренса карбамазепина. Для другой группы биообъектов (быстрый фенотип) – ингибирование.

3. Норма реакции организма на ФАВ может быть установлена по интенсивности митохондриального окисления.

Словарь терминов

Генотип – совокупность всех генов, присущих конкретной особи.

Фенотип – совокупность наблюдаемых характерных свойств организма, а также проявление его изменчивости, с учетом содержания и активности конститутивных (при рождении организма) биомолекулярных структур.

Референтный диапазон – 95 % результатов исследуемого показателя нормы, расположенные в пределах среднего значения $\pm 2\delta$.

Биомаркер воздействия – физиологически активное вещество, присутствующее в биосубстратах биообъекта, воздействует на геном и инициирует экспрессию генов.

Биомаркер эффекта – эндогенное соединение и (или) метаболиты вещества, являющиеся индикаторами нарушения функции органа или системы органов.

Информация о конфликте интересов

Авторы заявляют, что исследования проводились при отсутствии любых коммерческих или финансовых отношений, которые могли бы быть истолкованы как потенциальный конфликт интересов.

Сведения о рецензировании

Статья прошла открытое рецензирование двумя рецензентами, специалистами в данной области. Рецензии находятся в редакции журнала.

Список источников

1. Березовская И.В. Прогноз безопасности лекарственных средств в доклинических токсикологических исследованиях // Токсикологический Вестник. 2010. № 5 (104). С. 17–22.

2. Гуськова Т.А. Лекарственная токсикология и безопасность лекарственных средств // Сб. трудов IV съезда токсикологов России, 6–8 ноября 2013 г. Москва / Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. М.: Изд-во Capital Press, 2013. С. 14–16.

3. Патент РФ на изобретение № 2104539 (1998).

4. Жанатаев А.К., Дурнев А.Д. Актуальные задачи современной генетической токсикологии // Сб. трудов IV съезда токсиколо-

логов России, 6–8 ноября 2013; г. Москва / Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. М.: Изд-во Capital Press, 2013. С. 16–18.

5. Сычев Д.А., Раменская Г.В., Игнатьев И.В., Кукес В.Г. Клиническая фармакогенетика: Учебное пособие / Под ред. Кукеса В.Г., Бочкова Н.П. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. С. 35–36.

6. Пиотровский В.К. Метод статистических моментов и интегральные модельно-независимые параметры фармакокинетики // Фармакология и токсикология. 1986. № 5. С. 118–127.

7. Клиническая лабораторная диагностика: национальное руководство: в 2 т. Т. I / Под

ред. проф. Долгова В.В., проф. Меньшикова В.В. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. 928 с.

8. Патент РФ на изобретение № 2227296 (2004).

9. Маршалл В.Дж., Бангерт С.К. Клиническая биохимия, 6-е изд., перераб. и доп. / Пер. с англ. М.-СПб.: Изд. «БИНОМ»–«Диалект», 2014. С. 19.

10. Трахтенберг И.М., Сова Р.Е., Шефтель В.О.,

Оникиенко Ф.А. Проблема нормы в токсикологии (современные представления и методические подходы, основные параметры и константы) / Под ред. Трахтенберга И.М. М.: Медицина, 1991. 208 с.

11. Баевский Р.М. Прогнозирование состояний на грани нормы и патологии. М.: Медицина, 1979. 298 с.

Об авторах

Федеральное государственное бюджетное учреждение «33 Центральный научно-исследовательский испытательный институт» Министерства обороны Российской Федерации. 412918, Российская Федерация, Саратовская обл., г. Вольск-18, ул. Краснознаменная, д. 1.

Антонова Ольга Михайловна. Ведущий научный сотрудник, д-р биол. наук.

Адрес для переписки: Антонова Ольга Михайловна; 27nc_1@mil.ru

A New Method for Early Diagnostics of Pathological States under the Action of Physiologically Active Substances with Genotoxic Properties upon Organism

O.M. Antonova

Federal State Budgetary Establishment «33 Central Scientific Research Test Institute» of the Ministry of Defence of the Russian Federation, Krasnoznamennaya Street 1, Volsk-18, Saratov Region 412918, Russian Federation

The article is dedicated to the new method for early diagnostics of pathological conditions under the action of physiologically active substances with genotoxic properties. The method allows the evaluation of microsomal system of the liver under the action of xenobiotic alkylating type and the condition of microsomal oxidation system *in vivo*. It is supposed to assess preliminary the norm of the reaction of organism (phenotype of bio-object) by the intensity of microsomal oxidation during the study of the toxicological characteristics of physiologically active substances influencing the organism at low doses. The method includes the characteristics of hereditary intensity of epoxidation (hydroxylation) reactions of metabolism. Carbamazepine is used as a pharmacological probe. The article formulates the definition of the concept of norm, threshold for the harmful effect and prepatological state of organism.

Keywords: individual differences; population heterogeneity; phenotype; carbamazepine pharmacokinetics; xenobiotics alkylating type.

For citation: Antonova O.M. A New Method For Early Diagnostics of Pathological States under the Action of Physiologically Active Substances with Genotoxic Properties upon Organism // Journal of NBC Protection Corps. 2017. V. 1. № 1. P. 15–22.

Conflict of interest statement

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationship that could be construed as a potential conflict of interest.

Peer review information

The article has been peer reviewed by two experts in the respective field. Peer reviews are available from the Editorial Board.

References

1. Berezovskaya I.V. Forecasting of medicinal products safety in preclinical toxicological studies // Toxicological Review. 2010. № 5 (104). P. 17–22 (in Russian).
2. Guskova T.A. Drug toxicology and safety of drugs // A collection of papers from the IV Congress of Toxicologists of Russia (November 6–8, 2013, Moscow) / Federal Service for the Oversight of Consumer Protection and Welfare. Moscow: Capital Press, 2013. P. 283–285 (in Russian).
3. Cychev D.A., Ramenskaya G.V., Ignat'yev I.V., Kukes V.G. Clinical Pharmacogenetics // Ed. Kukes V.G., Bochkov N.P. Moscow: GEOTAR-Media, 2007. P. 35–36 (in Russian).
4. Zhanataev A.K., Durnev A.D. Actual problems of modern genetic toxicology // A collection of papers from the IV Congress of Toxicologists of Russia (November 6–8, 2013, Moscow) / Federal Service for the Oversight of Consumer Protection and Welfare. Moscow: Capital Press, 2013. P. 16–18 (in Russian).
5. Patent RU № 2104539 (1998) (in Russian).
6. Piotrovskii V.K. The method of statistical moments and the integral model-independent parameters of pharmacokinetics // Journal of Pharmacology and Toxicology. 1986. № 5. P. 118–127 (in Russian).
7. Dolgov V.V., Menshikov V.V. Clinical laboratory diagnostics. National Manual. In 2 vols. V. 1. Moscow: GEOTAR-Media, 2013. 928 p. (in Russian).
8. Patent RU № 2227296 (2004) (in Russian).
9. Marshall V.J., Bangert S.K. Clinical biochemistry, 6th ed., updated and revised // Transl. from Eng. Moscow – SPb.: BINOM-Dialect, 2014. P. 19 (in Russian).
10. Trakhtenberg I.M. Ed., Sova R.E., Sheftel' V.O., Onikienko F.A. The problem of norm in toxicology (contemporary concepts and methodological approaches, the main parameters and constants). Moscow; Meditsina, 1991. 208 p. (in Russian).
11. Bayevsky R.M. Forecasting of states on the verge of norm and pathology. Moscow; Meditsina, 1979. 298 p. (in Russian).

Authors

Federal State Budgetary Establishment «33 Central Scientific Research Test Institute» of the Ministry of Defence of the Russian Federation. Krasnoznamennaya Street 1, Volsk-18, Saratov Region 412918, Russian Federation.

Antonova O.M. Leading Researcher. Doctor of Biological Sciences.

Address: Antonova Olga Mikhailovna; 27nc_1@mil.ru