

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МОДЕЛИ И ИНСТРУМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ДЛЯ ОЦЕНКИ РИСКА В ГИГИЕНЕ И ЭПИДЕМИОЛОГИИ

УДК 615.9: [577.175.1.08: 631.811.98]: 613.26
DOI: 10.21668/health.risk/2017.3.14

ОСОБЕННОСТИ ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ГЕКСИЛОВОГО ЭФИРА 5-АМИНОЛЕВУЛИНОВОЙ КИСЛОТЫ И ОБОСНОВАНИЕ РЕГЛАМЕНТОВ ЕГО БЕЗОПАСНОГО ПРОИЗВОДСТВА И ПРИМЕНЕНИЯ

Е.К. Власенко

Научно-практический центр гигиены, Республика Беларусь, 220012, г. Минск, ул. Академическая, 8

Объектом исследования послужил регулятор роста растений гексильовый эфир 5-аминолевулиновой кислоты, синтезированный по оригинальной технологии Институтом биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси. Целью работы являлось установление особенностей токсического действия нового средства защиты растений на экспериментальных моделях in vivo/in vitro и обоснование комплекса гигиенических нормативов его содержания в различных средах, обеспечивающих его безопасное производство и применение. Исследование проведено с применением токсикологических, физиологических, гематологических, биохимических, иммунологических, цитогенетических, цитологических, статистических методов. Впервые выполнена токсикологическая оценка нового регулятора роста растений при различных режимах, дозах и путях поступления в организм лабораторных животных, позволившая установить параметры его токсикометрии, особенности биологического действия, проявляющиеся кожно-резорбтивными, кумулятивными и раздражающими слизистые оболочки свойствами, умеренной репродуктивной токсичностью без существенных признаков гонадотропного, мутагенного и аллергенного действия на организм. Установлено, что токсическое действие изучаемого соединения на организм сопровождается мембранотропными и цитотоксическими эффектами. Определены в хроническом эксперименте критерии и лимитирующие показатели вредного действия гексильового эфира 5-аминолевулиновой кислоты, на основании которых разработаны допустимая суточная доза для человека и ряд регламентов содержания препарата в объектах окружающей среды (воздух рабочей зоны и атмосферы, вода, почва), продовольственном сырье и пищевых продуктах (зерно хлебных злаков и рапса, рапсовое и льняное масло). Полученные результаты послужили основой для установления девяти гигиенических нормативов и использованы для государственной регистрации регулятора роста растений, что обеспечит безопасность его производства и применения в сельском хозяйстве.

Ключевые слова: гексильовый эфир 5-аминолевулиновой кислоты, регуляторы роста растений, токсичность, опасность, биологические эффекты, лабораторные животные, культуры клеток, гигиенические нормативы.

Перспективным направлением интенсификации сельскохозяйственного производства является применение регуляторов роста растений, которые дополняют эффективность использования удобрений и пестицидов. Регуляторами роста являются физиологически активные вещества природного или синтетического происхождения, которые путем воздействия на интенсивность и направленность процессов морфогенеза растений способствуют увеличению продуктивности растениеводства.

Развивая это направление, в Институте биоорганической химии НАН Беларуси создан

новый регулятор роста растений на основе гексильового эфира 5-аминолевулиновой кислоты (ГЭ-АЛК) [8], который оказывает эффективное стимулирующее действие на рост и развитие ряда сельскохозяйственных культур, а также повышает устойчивость растений к неблагоприятным условиям культивирования [3, 11, 12].

Для обеспечения безопасного опытно-промышленного синтеза и применения нового препарата необходимо осуществление его полной токсикологической оценки с обоснованием необходимых регламентов содержания в объектах среды обитания человека. Вышеизложенное

© Власенко Е.К., 2017

Власенко Евгений Константинович – научный сотрудник лаборатории профилактической и экологической токсикологии (e-mail: evgenii_vlasenko@mail.ru; тел.: 8 (017) 284-13-96).

свидетельствует об актуальности комплексных токсикологических исследований по оценке степени токсичности и опасности ГЭ-АЛК, установлению токсикодинамики и возможных механизмов вредного действия препарата на организм, обоснованию лимитирующих показателей вредности.

Цель работы – установить особенности токсического действия ГЭ-АЛК на экспериментальных моделях *in vivo/in vitro* и обосновать комплекс гигиенических нормативов, обеспечивающих его безопасное производство и применение.

Материалы и методы. Экспериментальные исследования, основанные на методических документах [5, 13, 14], проведены на 200 нелинейных белых мышах (17–23 г), 325 рандом-бредных белых крысах (180–210 г) и 3 белых кроликах (4,2–4,5 кг).

При проведении токсикологических исследований моделировали острые, подострые и хронические формы отравлений. В острых опытах параметры токсикометрии ГЭ-АЛК определяли при внутрижелудочном, эпикутанном, ингаляционном путях поступления в организм с последующим расчетом летальных доз методом пробит-анализа и определением величин показателей потенциальной опасности острого отравления. Способность к кумуляции в подострых опытах при внутрижелудочном введении и характер кожно-резорбтивного действия устанавливали на белых крысах в повторных 30-дневных опытах. Хронический эксперимент проведен на белых крысах, которым внутрижелудочно на протяжении 6 месяцев вводили ГЭ-АЛК в дозах 110, 30 и 11 мг/кг. Исследования и процедуры выполнены согласно руководствам и нормативным документам (ГОСТ 3 51000.3-96 и 51000.4-96; Европейская конвенция по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных или в иных научных целях (ETS № 123); Приказ МЗ РФ № 267 от 19.06.2003 г. Правила лабораторной практики (GLP)). Животных выводили из эксперимента с соблюдением требований Международных рекомендаций по проведению медико-биологических исследований с использованием животных (1997).

Изучение сенсibiliзирующей активности, раздражающего действия ГЭ-АЛК на слизистые оболочки глаза и на неповрежденные кожные покровы проводили в соответствии с инструкцией № 1.1.11–12–35–2004 [14].

Влияние ГЭ-АЛК на репродуктивную функцию белых крыс изучали по методу А.А. Динер-

ман [4]. Для оценки мутагенной активности использовали тест Эймса [17] и цитогенетический метод хромосомных aberrаций на лимфоцитах периферической крови человека [18]. Цитотоксические свойства ГЭ-АЛК изучали с использованием перевиваемых культур эмбриональных фибробластов человека (ЭФЧ) и аденокарциномы легкого человека А-549, культивируемых по методике L. Hayflick, P. S. Moorhead [19].

Для оценки состояния детоксикационной монооксигеназной системы использовали микросомальную фракцию печени белых крыс [20], в которой определяли содержание цитохромов P450 и P420, активность P450-редуктазы, кинетические параметры (K_m , V_{max}) реакций окисления 7-этоксикумарина и 7-этоксирезорурфина.

Изучение структурно-функциональных свойств мембран осуществляли с применением флуоресцентного зонда пирена, вносимого в суспензию теней эритроцитов белых крыс при воздействии ГЭ-АЛК в опытах *in vivo* и *in vitro* [2].

Результаты исследований обрабатывали общепринятыми методами. Различия между контрольными и опытными группами считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты токсиколого-гигиенической оценки нового соединения могут впоследствии использоваться для установления параметров безопасности по критериям допустимого риска.

Результаты и их обсуждение. При однократном внутрижелудочном введении ГЭ-АЛК белым мышам и крысам обоего пола установлены основные количественные параметры токсичности (DL_{16} , DL_{50} , DL_{84}) и опасности (S, R), которые не имеют видовых (коэффициент видовой чувствительности – 2,6) и половых различий и позволяют отнести препарат к умеренно опасным соединениям (таблица) [10].

В условиях моделирования острого ингаляционного отравления при максимально достижимой концентрации ГЭ-АЛК признаки интоксикации и гибель белых мышей отсутствовали, как и при однократном нанесении 50%-ного раствора на кожу белых крыс в дозе 800 мг/кг. Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии опасности острых отравлений при указанных путях воздействия.

При однократной инстилляции 50 мкл 50%-ного раствора ГЭ-АЛК в нижний конъюнктивный свод правого глаза кроликов наблюдали обильное слезотечение, умеренное покраснение сосудов конъюнктивы, отек век и блефароспазм, что позволяет отнести его к веществам

Параметры токсичности и потенциальной опасности острого отравления ГЭ-АЛК

Вид животных	Величина летальной дозы, мг/кг			Показатель потенциальной опасности острого отравления	
	DL ₁₆	DL ₅₀	DL ₈₄	S	R
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
Крысы, самцы	6350	8800 (6560÷11800)	12500	1,41 (0,97÷2,0)	1,97
Крысы, самки	4800	7800 (5740÷10600)	12600	1,62 (1,12÷2,35)	2,63

Примечания:

1. DL₁₆, DL₅₀, DL₈₄ – дозы, вызывающие 16 %, 50 %, 84 % летальных исходов.

2. S – функция угла наклона прямой «доза – эффект».

3. R – размах летальных доз.

с выраженным раздражающим действием. Признаки раздражающего действия препарата при однократном контакте с неповрежденными кожей покровами белых крыс отсутствовали.

Сенсибилизирующая способность ГЭ-АЛК, изученная в опытах на белых мышках на модели воспроизведения гиперчувствительности замедленного типа, не выявлена.

При внутрижелудочном введении самцам белых крыс ГЭ-АЛК в течение 30 суток наличие смертельных эффектов на уровне 1/5 DL₅₀ позволило рассчитать коэффициент кумуляции, равный 1,6, который характеризует препарат как высококумулятивное соединение. Наиболее выраженные изменения зарегистрированы при внутрижелудочном введении белым крысам ГЭ-АЛК в течение 30 суток в дозе 880 мг/кг (1/10 DL₅₀) в виде статистически значимых сдвигов поведенческой активности, увеличения суммационно-порогового показателя (СПП) на 78 % и относительных коэффициентов массы (ОКМ) внутренних органов – печени, сердца, легких, селезенки, почек и надпочечников. Со стороны гематологических показателей выявлено достоверное по сравнению с контролем снижение концентрации гемоглобина на 13 % и оксигемоглобина на 14 %, количества эритроцитов на 15 %, гематокрита на 12 %. О нарушении кислотно-основного состояния крови свидетельствует достоверное по сравнению с контролем снижение парциального давления кислорода на 24 %, увеличение парциального

давления углекислого газа на 14 % и бикарбонатной емкости крови на 13 %. В сыворотке крови белых крыс обнаружено повышение уровня активности гамма-глутамилтранспептидазы (ГГТ) в 1,5 раза ($p < 0,05$), аланинаминотрансферазы (АЛТ) – в 2,3 раза ($p < 0,05$), увеличение содержания общего билирубина – в 2,0 раза ($p < 0,05$), компонента комплемента С3 – в 1,5 раза и иммуноглобулина G – на 28 % ($p < 0,05$) по отношению к контролю. Наличие гиперферментемий, патофизиологической основой которых является повреждение мембран гепатоцитов, указывает на мембраноповреждающее действие соединения.

При субхроническом внутрижелудочном введении ГЭ-АЛК в дозе 440 мг/кг (1/20 DL₅₀) у подопытных крыс наблюдали изменения двигательной активности и увеличение СПП на 60 % ($p < 0,05$). По окончании эксперимента у подопытных животных зарегистрировано увеличение ОКМ сердца, почек и надпочечников ($p < 0,05$), снижение в периферической крови концентрации гемоглобина на 9 % и повышение уровня общего билирубина в 1,6 раза по сравнению с контролем ($p < 0,05$). При снижении вводимой дозы ГЭ-АЛК до 110 мг/кг (1/80 DL₅₀) выявлено лишь увеличение содержания в сыворотке крови белых крыс общего билирубина в 1,3 раза по отношению к контролю ($p < 0,05$).

Изучение кожно-резорбтивных свойств ГЭ-АЛК в виде 50%-ного раствора (864 мг/кг) в условиях 30-кратных аппликаций на кожу спины белых крыс не выявило внешних признаков интоксикации и гибели животных. Однако у животных наблюдалось повышение ферментативной активности АЛТ на 21,6 % ($p < 0,05$) и увеличение содержания мочевины на 22 % ($p < 0,05$) в сыворотке крови, снижение pH мочи до 6,0 ($p < 0,05$) по отношению к таковым в контрольной группе. Эпикутанное воздействие 25%-ного раствора ГЭ-АЛК в дозе 341 мг/кг приводило к увеличению активности АЛТ в сыворотке крови белых крыс на 29,6 % ($p < 0,05$). При снижении уровня воздействия ГЭ-АЛК до 75 мг/кг (5%-ный раствор) изменения биохимических показателей не выявлены.

Проведение регламентации нового регулятора роста растений требует определения его влияния на репродуктивную функцию и изучение мутагенного действия [5].

Однократное внутрижелудочное введение препарата самкам белых крыс в дозе 1/2 DL₅₀ (3900 мг/кг) в периоды интенсивного органогенеза вызывало клинические проявления инток-

сикации, однако гибели эмбрионов и признаков тератогенного действия не обнаружено. Преплантационная смертность у экспериментальных животных выражена незначительно. Постимплантационная смертность в опытных группах и контроле отсутствует. Для процессов постнатального развития наиболее критичным оказалось воздействие препарата на 9-й день беременности, о чем свидетельствует отставание физического развития крысят на 13 % по массе и на 5 % по длине тела ($p < 0,05$). Полученные данные указывают на умеренную репродуктивную токсичность ГЭ-АЛК. При многократном воздействии в течение всей беременности в дозе, кратной $1/40 \text{ DL}_{50}$ (195 мг/кг), изучаемое соединение не проявляет эмбриотропного и тератогенного действия, не оказывает отрицательного влияния на постнатальное развитие потомства.

В условиях субхронического внутрижелудочного введения самцам белых крыс в дозе 440 мг/кг ($1/20 \text{ DL}_{50}$) ГЭ-АЛК проявляет слабое гонадотоксическое действие по морфофункциональным показателям гонад, что выражалось увеличением ОКМ семенников на 12 % ($p < 0,05$) и снижением времени движения сперматозоидов в 1,6 раза ($p < 0,05$) по отношению к контролю. При снижении вводимой дозы до 110 мг/кг указанные изменения отсутствовали.

Таким образом, эмбриотропный и гонадотропный эффекты воздействия зарегистрированы только на фоне поступления массивных доз препарата, приводящих к интоксикации родительских организмов, что позволяет рассматривать изменения в показателях репродуктивной системы как признаки проявления общетоксического действия ГЭ-АЛК [9].

Потенциальной мутагенной активности ГЭ-АЛК в концентрациях 1 и 10 мкг/мл в тесте Эймса на штамме *S. typhimurium TA 100* в условиях с метаболической активацией и без нее не установлено, как и в цитогенетическом тесте на периферических лимфоцитах человека *in vitro* при уровнях воздействия 0,05, 0,1 и 0,25 мг/мл [1].

Для выявления механизма токсического действия ГЭ-АЛК изучено состояние детоксикационной монооксигеназной системы печени белых крыс при субхроническом внутрижелудочном введении дозы 440 мг/кг. Установлено достоверное увеличение удельного содержания цитохрома P450 в 1,4 раза и увеличение удельной активности P450-редуктазы в 1,5 раза, при этом максимальная скорость V_{max} и константа Михаэлиса–Ментен K_m реакций окисления 7-это-

ксикумарина и 7-этоксирезорурфина не отличались от контрольных. Следует отметить повышение у подопытных животных уровня удельного содержания цитохрома P420 в 3,0 раза по сравнению с контрольным ($p < 0,05$), что может указывать на способность изучаемого препарата дестабилизировать мембраны эндоплазматического ретикулума.

Результаты проведенных *in vitro* опытов на культурах ЭФЧ и А-549 показали, что ГЭ-АЛК в концентрации $2 \cdot 10^{-3}$ моль·л⁻¹ приводит к дегенерации монослоя с отделением клеток от стекла. В концентрации $2 \cdot 10^{-4}$ моль·л⁻¹ препарат подавляет пролиферацию клеток ЭФЧ в 2,8 раза, клеток А-549 в 6,3 раза по сравнению с контрольными данными. В опытах с уровнем воздействия $2 \cdot 10^{-5}$ моль·л⁻¹ ГЭ-АЛК не наблюдали существенного влияния препарата на пролиферативную активность исследуемых культур: за время опыта количество клеток ЭФЧ увеличилось в 16 раз, а клеток линии А-549 – в 26 раз по сравнению с исходным состоянием до внесения препарата, что соответствует пределам нормального роста данных линий в условиях *in vitro*. Рассчитанная величина среднеэффективной концентрации цитотоксического действия CL_{50} составляет для культуры ЭФЧ $1,14 \cdot 10^{-4}$ ($1,08 \cdot 10^{-4} \div 1,21 \cdot 10^{-4}$) моль·л⁻¹, для культуры А-549 – $0,5 \cdot 10^{-4}$ ($0,48 \cdot 10^{-4} \div 0,54 \cdot 10^{-4}$) моль·л⁻¹.

В диапазоне реализации цитотоксического действия изучено влияние данного соединения на структурно-функциональные показатели состояния липидного бислоя *in vitro* при введении флуоресцентного зонда пирена в суспензию теней эритроцитов интактных крыс. Добавление ГЭ-АЛК в концентрациях $2 \cdot 10^{-5}$, $2 \cdot 10^{-4}$, $2 \cdot 10^{-3}$ моль·л⁻¹ приводило к тушению флуоресценции пирена без изменения коэффициента эксимеризации – соотношения между эксимерами F_3 при $\lambda_{эм}$ 475 нм и мономерами F_m при $\lambda_{эм}$ 373 нм, что свидетельствует о деградации липидного бислоя.

Исследование структурно-функциональных параметров мембран эритроцитов в субхроническом эксперименте *in vivo* на белых крысах указывает на зависимое от воздействия ГЭ-АЛК в дозе 440 мг/кг снижение микровязкости липидного бислоя и аннулярного (прибелкового) липида, о чем свидетельствует увеличение коэффициентов эксимеризации, при этом показатели их полярности оставались в пределах контрольных значений. Исследование интенсивности безызлучательного переноса энергии электронного возбуждения с триптофановых ос-

татков на пирен выявило достоверное снижение данного показателя на 38 % ($p < 0,05$), что указывает на уменьшение погруженности белковых молекул в липидный бислой.

Хроническое внутрижелудочное введение белым крысам ГЭ-АЛК в дозах 110, 30 и 11 мг/кг в течение 6 месяцев не вызывало клинических проявлений интоксикации и гибели. Со стороны нервной системы при дозе 110 мг/кг наблюдали у подопытных животных снижение двигательной активности и величины СПП на 34 % по отношению к контролю ($p < 0,05$). Воздействие ГЭ-АЛК не приводило к изменению биохимических показателей сыворотки крови, в том числе маркерного параметра субхронического воздействия – уровня общего билирубина. О нарушении состояния мочевыводящей системы свидетельствуют достоверное снижение величины показателя водородных ионов мочи (рН 6,2), снижение суточного диуреза в 4,3 раза и клиренса креатинина в 2,6 раза по отношению к контролю.

При хроническом внутрижелудочном введении белым крысам ГЭ-АЛК в дозе 30 мг/кг обнаружено лишь достоверное снижение СПП на 35 %, что позволило определить данный уровень воздействия в качестве порога хронического действия (Lim_{chr}). Таким образом, лимитирующим показателем хронического общетоксического действия ГЭ-АЛК является функциональное состояние нервной системы по изменению СПП.

Проявления токсического действия препарата отсутствовали при дозе 11 мг/кг (максимальная недействующая), что позволило использовать данную величину для расчета допустимой суточной дозы (ДСД) ГЭ-АЛК. Учитывая высококумулятивные свойства соединения, максимальная недействующая доза снижена в 100 раз (коэффициент запаса), что определило величину ДСД на уровне 0,11 мг/кг. Допустимое суточное поступление (ДСП) для человека с учетом ДСД и средней массы 50 кг не должно превышать 5,5 мг/сут (суммарное количество препарата, поступающее из разных сред).

Прогнозные значения ориентировочно безопасного уровня воздействия (ОБУВ) в воздухе рабочей зоны ГЭ-АЛК рассчитывали по формулам, предложенным для всех групп пестицидов [16]. Результаты анализа полученных значений показали, что наиболее низкое расчетное значение гигиенического норматива – 0,8 мг/м³.

ОБУВ ГЭ-АЛК в атмосферном воздухе установлен на уровне 0,01 мг/м³ по расчетам [7], учитывающим молекулярную массу, основные параметры токсичности и величину ОБУВ

в воздухе рабочей зоны. При данной величине ОБУВ в организм человека с атмосферным воздухом может поступить 0,2 мг ГЭ-АЛК, что составит 3,6 % от ДСП для человека.

Для прогноза ориентировочно допустимого уровня (ОДУ) в воде применяли уравнения, отражающие корреляционные связи между этой величиной, установленными токсикологическими параметрами (DL_{50}), нормативами в других объектах окружающей среды (воздух рабочей зоны), физическими константами [6]. Минимальное расчетное значение ОДУ ГЭ-АЛК составило 0,1 мг/дм³. Результаты органолептических исследований воды, содержащей ГЭ-АЛК на уровне минимального расчетного значения, показали, что запах при 20 °С и 60 °С отсутствует.

Ориентировочно допустимая концентрация (ОДК) ГЭ-АЛК в почве рассчитана по величине ДСД [15] и составляет 0,3 мг/кг. Агротехническое применение препарата для предпосевной обработки семян ячменя, рапса, льна-долгунца при рекомендуемых нормах расхода до 3 г/т (до 150 мг/га) не приведет к превышению установленного ОДК в почве.

Так как препарат предназначен для применения при возделывании ярового ячменя, озимого рапса и льна-долгунца, то выполнено расчетное обоснование максимальных допустимых уровней остаточных количеств (МДУ_{ок}) ГЭ-АЛК в зерне хлебных злаков, рапсе (зерно, масло) и льне (масло).

С пищевым рационом в организм человека может поступить до 70 % остаточных количеств средства защиты растений, обнаруживающегося во всех средах. В этом случае расчетное безопасное поступление ГЭ-АЛК с пищевыми продуктами составит 3,85 мг/чел./сут.

При определении МДУ_{ок} ГЭ-АЛК в зерне хлебных злаков (0,1 мг/кг) и рапса (0,6 мг/кг), масле рапса и льна (0,6 мг/кг) учитывали нормы среднесуточного потребления пищевых продуктов.

Следовательно, возможное суточное поступление ГЭ-АЛК в организм человека с учетом установленных нормативов для различных сред составит: с пищевыми продуктами – 0,11 мг (2 % от ДСП), с водой – 0,3 мг (5,5 % от ДСП), воздухом – 0,2 мг (3,6 % от ДСП), в сумме 11,1 % от ДСП.

Таким образом, по результатам токсикологической оценки обоснован ряд гигиенических регламентов ГЭ-АЛК в среде обитания человека: ОБУВ в воздухе рабочей зоны – 0,8 мг/м³, ОБУВ в атмосферном воздухе – 0,01 мг/м³, ОДУ в воде водоемов – 0,1 мг/дм³, ОДК в поч-

ве – 0,3 мг/кг, ДСД – 0,1 мг/кг, МДУ_{ок} в зерне хлебных злаков – 0,1 мг/кг, рапс (зерно, масло), лен-долгунец (масло) – 0,6 мг/кг.

Выводы. В результате проведения комплексных токсиколого-гигиенических исследований нового регулятора роста растений ГЭ-АЛК при различных режимах, дозах и путях поступления в организм лабораторных животных установлены параметры его токсикометрии, особенности биологического действия, проявляющиеся кожно-резорбтивными, кумулятивными и раздражающими слизистые оболочки свойствами, умеренной репродуктивной токсичностью без существенных признаков гонадотропного, мутагенного и аллергенного действия на организм. Установлено, что токсическое

действие ГЭ-АЛК на организм сопровождается мембранотропными и цитотоксическими эффектами. В хроническом эксперименте определены лимитирующие показатели вредного действия ГЭ-АЛК, на основании которых разработаны допустимая суточная доза для человека и ряд регламентов содержания препарата в объектах окружающей среды (воздух рабочей зоны и атмосферы, вода, почва), продовольственном сырье и пищевых продуктах (зерно хлебных злаков и рапса, рапсовое и льняное масло).

Полученные данные могут рассматриваться как исходные для установления референтных уровней безопасности по критериям допустимого риска для здоровья.

Список литературы

1. Бойко М.М., Власенко Е.К. Изучение мутагенной активности гексилового эфира 5-аминолевулиновой кислоты в тестах *in vitro* // Здоровье и окружающая среда: сборник научных трудов / Министерство здравоохранения Респ. Беларусь; Науч.-практ. центр гигиены; гл. ред. С.И. Сычик. – Минск, 2015. – Вып. 25. – Т. 2. – С. 79–82.
2. Владимиров Ю.А., Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. – М.: Наука, 1980. – 320 с.
3. Влияние инкрустирующих составов на основе гексилового эфира 5-аминолевулиновой кислоты на рост и продуктивность растений льна-долгунца (*Linum usitatissimum L.*) / Е.Л. Недведь, А.В. Тумилович, Е.Б. Яронская, М.А. Кисель, И.В. Тростянка, В.И. Долгопалец, А.Н. Ермолович // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем: сборник статей международной научной конференции; ред. И.Д. Вологовский [и др.]. – Минск, 2012. – Ч. 2. – С. 65–67.
4. Динерман А.А. Роль загрязнителей окружающей среды в нарушении эмбрионального развития: монография. – М.: Медицина, 1980. – 192 с.
5. Методические указания по гигиенической оценке новых пестицидов № 4263-87 / утв. Министерством здравоохранения СССР 13.03.1987 г.; Всесоюзный научно-исследовательский институт гигиены и токсикологии пестицидов, полимеров и пластмасс; сост. Е.А. Антонова [и др.]. – Киев, 1988. – 187 с.
6. Методические указания по применению расчетных и экспресс-экспериментальных методов при гигиеническом нормировании химических соединений в воде водоемов № 1943-78 / утв. зам. гл. санитар. врача СССР 08.12.1978 г. – М.: МЗ СССР, 1979. – 28 с.
7. Методические указания по установлению ориентировочно безопасных уровней воздействия (ОБУВ) и класса опасности загрязняющих веществ в атмосферном воздухе населенных мест № 11-7-2-97 / утв. Министерством здравоохранения Республики Беларусь 14.03.1997 г. – Минск, 1998. – 27 с.
8. Новый подход к синтезу липофильных эфиров 5-аминолевулиновой кислоты / И.В. Тростянка, В.И. Долгопалец, М.А. Кисель, Ф.А. Лахвич / Доклады Национальной академии наук Беларуси. – 2009. – Т. 53, № 3. – С. 87–89.
9. Особенности влияния гексилового эфира 5-аминолевулиновой кислоты на репродуктивные функции белых крыс / Е.К. Власенко, С.И. Сычик, В.А. Стельмах, И.И. Ильюкова, В.А. Грынчак // Вестник Витебского государственного медицинского университета. – 2015. – Т. 14, № 3. – С. 83–89.
10. Особенности токсического действия гексилового эфира 5-аминолевулиновой кислоты в условиях однократного и многократного внутрижелудочного введения / Е.К. Власенко, С.И. Сычик, В.А. Стельмах, В.А. Грынчак // Токсикологический вестник. – 2015. – № 5. – С. 31–36.
11. Применение инкрустирующих составов на основе гексилового эфира 5-аминолевулиновой кислоты для стимуляции роста и повышения продуктивности сельскохозяйственных культур / Е.Б. Яронская, Н.Г. Аверина, Е.Л. Недведь, А.В. Тумилович, М.А. Кисель, И.В. Тростянка, Л.А. Булавин, И.Г. Бруй, А.Н. Ермолович // Фитогормоны, гуминовые вещества и другие биорациональные пестициды в сельском хозяйстве: сборник материалов 7-й Международной конференции молодых ученых «Radostim 2011». – Минск, 2011. – С. 193–194.
12. 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 // Доклады Национальной академии наук Беларуси. – 2007. – Т. 51, № 5. – С. 95–99.
13. Токсиколого-гигиеническая оценка регуляторов роста растений: инструкция № 1.1.11-12-210-2003 / А.И. Котеленец [и др.] // Сборник официальных документов по медицине труда и производственной санитарии / под общ. ред. В.П. Филонова, С.М. Соколова. – Минск: ПЧУП «Бизнесофсет», 2004. – Ч. 14. – С. 63–117.

14. Требования к постановке экспериментальных исследований для первичной токсикологической оценки и гигиенической регламентации веществ: инструкция № 1.1.11–12–35–2004 / утв. Министерством здравоохранения Республики Беларусь 14.12.2004 г. – Минск, 2004. – 43 с.

15. Ускоренное гигиеническое регламентирование экзогенных химических веществ в почве: методические рекомендации № 127-0010 / утв. главным гос. санитар. врачом Республики Беларусь 13.11.2000 г.; сост. А.Н. Котелелец [и др.]. – Минск: Белорусский научно-исследовательский санитарно-гигиенический институт, 2000. – 52 с.

16. Экспериментальное обоснование и расчет ОБУВ вредных веществ в воздухе рабочей зоны: метод-рекламации № 118-0010 / утв. Министерством здравоохранения Республики Беларусь 13.10.2000 г. – Минск, 2010. – 33 с.

17. Ames B.N., McCann J., Yamasaki E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella/mammalian* microsome mutagenicity test // *Mutat. Res.* – 1975. – Vol. 3, № 1. – P. 347–364.

18. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood / P.S. Moorhead [et al.] // *Exp. Cell. Res.* – 1960. – Vol. 20. – P. 613–616.

19. Hayflick L., Moorhead P.S. The serial cultivation of human diploid cell strains // *Exp. Cell Res.* – 1961. – Vol. 25. – P. 585–621.

20. Hoeven T.A., Coon M.J. Preparation and properties of partially purified cytochrome P-450 and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-cytochrome P-450 reductase from rabbit liver microsomes // *The J. of Biol. Chem.* – 1974. – Vol. 249, № 19. – P. 6302–6310.

Власенко Е.К. Особенности токсического действия гексилового эфира 5-аминолевулиновой кислоты и обоснование регламентов его безопасного производства и применения // Анализ риска здоровью. – 2017. – № 3. – С. 118–126. DOI: 10.21668/health.risk/2017.3.14

UDC 615.9:[577.175.1.08:631.811.98]:613.26

DOI: 10.21668/health.risk/2017.3.14.eng

PECULIARITIES OF TOXIC EFFECTS EXERTED BY HEXYL ETHER OF 5-AMINOLEVULINIC ACID AND GROUNDS FOR WORKING OUR REGULATIONS OF ITS SAFE PRODUCTION AND APPLICATION

Е.К. Vlasenko

Scientific-practical Hygiene Center, 8 Akademicheskaya Str., Minsk, 220012, Republic of Belarus

Our research object was hexyl ether of 5-aminolevulinic acid applied as plants growth regulator which was synthesized with an original technology by Bioorganic Chemistry Institute of Belarus National Academy of science. Our research goal was to determine peculiarities of toxic effects exerted by this new plants protector on experimental models in vivo/in vitro and to give grounds for hygienic standards of its contents in various media which were to provide its safe production and application. We conducted our research with the use of toxicological, physiological, hematological, biochemical, immunologic, cytogenetic, cytological, and statistical methods. We were the first to perform toxicological assessment of this new plants growth regulator under different regimes, doses and ways of introduction into laboratory animals' bodies and it helped us to detect its toxicometric parameters and peculiarities of its biological effects which became apparent through skin-resorptive and cumulative properties, irritating impacts on mucous tunics, moderate reproductive toxicity without substantial signs of gonadotropic, mutagenic, and allergenic impacts on a body. We detected that toxic impacts exerted by the examined substance on a body was combined with membrane-tropic and cytotoxic effects. We determined criteria and limiting parameters of hazardous effects exerted by hexyl ether of 5-aminolevulinic acid in the course of a chronic experiment, and it gave us grounds for fixing allowable daily dose for a man and for working out a number of regulations on the substance contents in environmental objects (working area air, water, and soil), in food raw materials, and in food products (grain, rape, rape and linen oil). The obtained results were used as a basis for fixing 9 hygienic standards and were used for the state registration of this plant growth regulator; it will provide its safe production and application in agriculture.

Key words: hexyl ether of 5-aminolevulinic acid, plants growth regulators, toxicity, danger, biological effects, laboratory animals, cells cultures, hygienic standards.

© Vlasenko E.K., 2017

Evgeniy K. Vlasenko – researcher at preventive and ecological toxicology laboratory (e-mail: evgenii_vlasenko@mail.ru; tel.: +7 (017) 284-13-96).

References

1. Boiko M.M., Vlasenko E.K. Izuchenie mutagennoi aktivnosti geksilovogo efira 5-aminolevulinovoi kisloty v testakh in vitro [Studying mutagenic activity of hexyl ether of 5-aminolevulinic acid via in vitro tests]. *Zdorov'e i okruzhayushchaya sreda: sbornik nauchnykh trudov*. In: S.I. Sychik ed. Minsk, 2015, vol. 2, pp. 79–82 (in Russian).
2. Vladimirov Yu.A., Dobretsov G.E. Fluorescentnye zondy v issledovanii biologicheskikh membrane [Fluorescent probes in biological membranes studies]. Moscow, Nauka, Publ., 1980, 320 p. (in Russian).
3. Nedved' E.L., Tumilovich A.V., Yaronkaya E.B., Kisel' M.A., Trostyanko I.V., Dolgopalets V.I., Ermolovich A.N. Vliyanie inkrustiruyushchikh sostavov na osnove geksilovogo efira 5-aminolevulinovoi kisloty na rost i produktivnost' rastenii l'na-dolguntsa (*Linum usitatissimum* L.) [Influence exerted by incrusting compounds on the basis of hexyl ether of 5-aminolevulinic acid on fiber flax plants (*Linum usitatissimum* L.) growth and productivity]. *Molekulyarnye, membrannye i kletochnye osnovy funktsionirovaniya biosistem: sbornik statei mezhdunarodnoi nauchnoi konferentsii [Molecular, membrane and cellular grounds of biological systems functioning: a collection of papers from an international scientific conference]*. In: I.D. Volotovskii [et al.] eds. Minsk, 2012, part 2, pp. 65–67 (in Russian).
4. Dinerman A.A. Rol' zagryaznitelei okruzhayushchei sredy v narushenii embrional'nogo razvitiya: monografiya [Contribution made by environment contaminants into embryo development disorders: a monograph]. Moscow, Meditsina Publ., 1980, 192 p. (in Russian).
5. Metodicheskie ukazaniya po gigienicheskoi otsenke novykh pestitsidov № 4263-87: utv. Ministerstvom zdavookhraneniya SSSR 13.03.1987 [Methodical guidelines on hygienic assessment of new pesticides No. 4263-87: approved by the USSR Public healthcare Ministry on March 13, 1987]. In: E.A. Antonova [et al.] eds. Kiev, 1988, 187 p. (in Russian).
6. Metodicheskie ukazaniya po primeneniyu raschetnykh i ekspres-eksperimental'nykh metodov pri gigienicheskom normirovanii khimicheskikh soedinenii v vode vodoemov № 1943-78: utv. zam. gl. sanit. vracha SSSR 08.12.1978 [Methodical guidelines on application of calculation and express-experimental techniques in hygienic standardization of chemicals contents in reservoirs water No. 1943-78: approved by deputy to Chief sanitary inspector of the USSR on December 08, 1978]. Moscow, MZ SSSR, Publ., 1979, 28 p. (in Russian).
7. Metodicheskie ukazaniya po ustanovleniyu orientirovochno bezopasnykh urovnei vozdeystviya (OBUV) i klassa opasnosti zagryaznyayushchikh veshchestv v at-mosfernom vozduke naseleennykh mest № 11-7-2-97: utv. Ministerstvom zdavookhraneniya Respubliki Belarus' 14.03.1997 [Methodical guidelines on determining tentatively safe impacts levels and danger category of air contaminants in settlements No. 11-7-2-97: approved by Belarus Public Healthcare Ministry on March 14, 1997]. Minsk, 1998, 27 p. (in Russian).
8. Trostyanko I.V., Dolgopalets V.I., Kisel' M.A., Lakhvich F.A. Novyi podkhod k sintezu lipofil'nykh efirov 5-aminolevulinovoi kisloty [A new approach to synthesizing lipophilic ethers of 5-aminolevulinic acid]. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi*, 2009, vol. 53, no. 3, pp. 87–89 (in Russian).
9. Vlasenko E.K., Sychik S.I., Stel'makh V.A., Il'yukova I.I., Grynychak V.A. Osobennosti vliyaniya geksilovogo efira 5-aminolevulinovoi kisloty na reproduktivnye funktsii belykh krysov [The peculiarities of hexyl ester of 5-aminolevulinic acid influence on the reproductive functions of white rats]. *Vestnik Vitebskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta*, 2015, vol. 14, no. 3, pp. 83–89 (in Russian).
10. Vlasenko E.K., Sychik S.I., Stel'makh V.A., Grynychak V.A. Osobennosti toksicheskogo deystviya geksilovogo efira 5-aminolevulinovoi kisloty v usloviyakh odno- i mnogokratnogo vnutrizheludochnogo vvedeniya [Features of toxic effect of 5-aminolevulinic acid hexyl ester at single and multiple intragastric administrations]. *Toksikologicheskii vestnik*, 2015, no. 5, pp. 31–36 (in Russian).
11. Yaronkaya E.B., N Averina.G., Nedved'E.L., Tumilovich A.V., Kisel' M.A., Trostyanko I.V., Bulavin L.A., Brui I.G., Ermolovich A.N. Primenenie inkrustiruyushchikh sostavov na osnove geksilovogo efira 5-aminolevulinovoi kisloty dlya stimulyatsii rosta i povysheniya produktivnosti sel'skokhozyaistvennykh kul'tur [Application of incrusting compounds on the basis of hexyl ether of 5-aminolevulinic acid for growth stimulation and increase in agriculture productivity]. *Fitogormony, guminovye veshchestva i drugie bioratsional'nye pestitsidy v sel'skom khozyaistve: sbornik materialov 7-i mezhdunarodnoi konferentsii molodykh uchennykh «Radostim 2011» [Phyto-hormones, humic substances and other biorational pesticides in agriculture: materials of the 7-th international conference of young scientists «Radostim 2011»]*. Minsk, 2011, pp.193–194 (in Russian).
12. Spivak S.G., Yaronkaya E.B., Vershilovskaya I.V., Davydov V.Yu., Trostyanko I.V., Dolgopalets V.I., Averina N.G., Kisel' M.A. Stimulyatsiya rosta i razvitiya rastenii yachmenya lipofil'nymi efirami 5-aminolevulinovoi kisloty [Stimulation of barley growth and development with lipophilic ethers of 5-aminolevulinic acid]. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi*, 2007, vol. 51, no. 5, pp. 95–99 (in Russian).
13. Kotelenets A.I. [et al.]. Toksikologo-gigienicheskaya otsenka regulyatorov rosta rastenii: instruktsiya № 1.1.11-12-210-2003 [Toxicological and hygienic assessment of plants growth regulators: instruction No. 1.1.11-12-210-2003]. *Sbornik ofitsial'nykh dokumentov po meditsine truda i proizvodstvennoi sanitaria*. In: V.P. Filonov, S.M. Sokolov, eds. Minsk, PChUP "Biznesofset", Publ., 2004, part 14, pp. 63–117 (in Russian).

14. Trebovaniya k postanovke eksperimental'nykh issledovaniy dlya pervichnoi toksikologicheskoi otsenki i gigenicheskoi reglamentatsii veshchestv: instruktsiya № 1.1.11–12–35–2004; utv. Ministerstvom zdavookhraneniya Respubliki Belarus' 14.12.2004 [Requirements to experimental research procedures for primary toxicological assessment and hygienic standardization of substances: Instruction No. 1.1.11–12–35–2004; approved by Belarus Public Healthcare Ministry on December 14, 2004]. Minsk, 2004, 43 p. (in Russian).

15. Uskorennoe gigenicheskoe reglamentirovanie ekzogenykh khimiche-skikh veshchestv v pochve: metodicheskie rekomendatsii; utv. glavnym gos. sanitar. vrachom Respubliki Belarus' 13.11.2000 № 127-0010 [Accelerated hygienic standardization of exogenous chemicals in soils: methodical guidelines; approved by Chief sanitary inspector of Belarus on November 13, 2000 No. 127-0010]. Minsk, Belorusskii nauchno-issledovatel'skii sanitarno-gigenicheskii institute, Publ., 2000, 52 p. (in Russian).

16. Eksperimental'noe obosnovanie i raschet OBUV vrednykh veshchestv v vozdukhke rabochei zony: metodreklomendatsii № 118-0010; utv. Ministerstvom zdavookhraneniya Respubliki Belarus' 13.10.2000 [Experimental grounds and calculation of tentatively safe impacts by hazardous substances in working area air: methodical guidelines No. 118-0010; approved by Belarus Public Healthcare Ministry on October 13, 2000]. Minsk, 2010, 33 p.

17. Ames B.N., McCann J., Yamasaki E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*; mammalian microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.*, 1975, vol. 3, no. 1, pp. 347–364.

18. Moorhead P.S. [et al.] Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell. Res.*, 1960, vol. 20, pp. 613–616.

19. Hayflick L., Moorhead P.S. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell. Res.*, 1961, vol. 25, pp. 585–621.

20. Hoeven T.A., Coon M.J. Preparation and properties of partially purified cytochrome P-450 and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-cytochrome P-450 reductase from rabbit liver microsomes. *The J. of Biol. Chem.*, 1974, vol. 249, no. 19, pp. 6302–6310.

Vlasenko E.K. Peculiarities of toxic effects exerted by hexyl ether of 5-aminolevulinic acid and grounds for working our regulations of its safe production and application. Health Risk Analysis, 2017, no. 3, pp. 118–126. DOI: 10.21668/health.risk/2017.3.14.eng

Получена: 22.12.2016

Принята: 20.02.2017

Опубликована: 30.06.2017