



ТОКСИЧНОСТЬ ЙЕССОТОКСИНА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ *IN VIVO*

О.В. Багрянцева^{1,2}, И.В. Гмошинский¹, А.Д. Евстратова¹, Э.Н. Трушина¹,
О.К. Мустафина¹, Х.С. Сото¹, В.А. Шипелин¹, А.А. Шумакова¹, А.Д. Панова²,
С.А. Хотимченко^{1,2}

¹Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи, Россия, 109240, г. Москва, Устьинский проезд, 2/14

²Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова, Россия, 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

Йессотоксин (УТХ) является полиэфиром. Известно более 90 производных йессотоксина. УТХ исключен из группы диарейных токсинов, потому что, в отличие от охадаиковой кислоты, не вызывает диарею. Химическая структура УТХ аналогична таковой бриветоксинов и сизаутоксинов, которые оказывают действие на работу кальций-натриевого насоса и трансмембранных ионных каналов. Следовательно, УТХ способен оказывать влияние на работу всех органов и систем организма. Известно, что УТХ является промотором апоптоза в ткани головного мозга. Среднелетальная доза ЛД₅₀УТХ и его аналогов в различных экспериментах, проведенных на мышах, составила от 100 до 500–750 мкг/кг. Безопасный уровень острого воздействия УТХ (ARfD) составляет 25 мкг/кг массы тела.

*В настоящее время установлены показатели токсичности для УТХ и некоторых его аналогов, определены основные механизмы его действия, роль в качестве промотора апоптоза. Несмотря на растущее число данных о биологических эффектах, оказываемых УТХ на теплокровный организм, точный механизм его действия в настоящее время неизвестен. Целью настоящей работы явилось исследование токсичности УТХ в экспериментах *in vivo* в дозировках ниже установленного безопасного уровня острого воздействия.*

Эксперимент проведен на 72 крысах-самцах линии Wistar с исходной массой тела 100 ± 10 г. Животные получали сухой сбалансированный корм производства фирмы ООО «Лабораторкорм» (Россия) в режиме неограниченного доступа. В работе использовали препарат УТХ производства фирмы National Research Council Canada (Канада) в виде метанольного раствора (содержание УТХ 4,3 мкмоль). Определяли массу внутренних органов, биохимические и гематологические показатели крови, апоптоз клеток головного мозга, уровень малонового диальдегида в головном мозге и восстановленного глутатиона в печени.

Показано, что дозы УТХ (2; 8 и 12 мкг/кг) ниже ARfD = 2 мкг/кг могут оказать токсическое воздействие на теплокровный организм. Полученные данные свидетельствуют о необходимости проведения дополнительных оценок рисков увеличения максимально допустимого уровня содержания йессотоксинов в моллюсках с 1,0 до 3,75 мкг/кг.

Ключевые слова: йессотоксин, механизмы действия, *in vivo*, биомаркеры, токсичность, оценка риска, допустимый уровень.

© Багрянцева О.В., Гмошинский И.В., Евстратова А.Д., Трушина Э.Н., Мустафина О.К., Сото Х.С., Шипелин В.А., Шумакова А.А., Панова А.Д., Хотимченко С.А., 2018

Багрянцева Ольга Викторовна – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории пищевой токсикологии и оценки безопасности нанотехнологий (e-mail: olga_bagryanseva@mail.ru; тел.: 8 (495) 698-54-05).

Гмошинский Иван Всеволодович – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории пищевой токсикологии и оценки безопасности нанотехнологий (e-mail: gmosh@ion.ru; тел.: 8 (495) 698-53-71).

Евстратова Анна Дмитриевна – лаборант-исследователь лаборатории пищевой токсикологии и оценки безопасности нанотехнологий (e-mail: anya.evstratova@mail.ru; тел.: 8 (495) 698-53-68).

Трушина Элеонора Николаевна – кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией иммунологии (e-mail: trushina@ion.ru; тел.: 8 (495) 698-53-45).

Мустафина Оксана Константиновна – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории иммунологии (e-mail: mustafina@ion.ru; тел.: 8 (495) 698-53-45).

Сото Селада Хорхе – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории метаболомного и протеомного анализа (e-mail: jsotoc@mail.ru; тел.: 8 (495) 698-54-07).

Шипелин Владимир Александрович – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории пищевой токсикологии и оценки безопасности нанотехнологий (e-mail: v.shipelin@yandex.ru; тел.: 8 (495) 698-63-71).

Шумакова Антонина Александровна – научный сотрудник лаборатории пищевой токсикологии и оценки безопасности нанотехнологий (e-mail: antonina_sh@list.ru; тел.: 8 (495) 698-53-68).

Хотимченко Сергей Анатольевич – доктор медицинских наук, профессор, заведующий лабораторией пищевой токсикологии и оценки безопасности нанотехнологий (e-mail: hotimchenko@ion.ru; тел.: 8 (495) 698-52-35).

Йессотоксин (УТХ) является полиэфиром, состоящим из 11 смежных эфирных колец, ненасыщенной боковой цепи и двух эфиров сульфата. Известно более 90 производных йессотоксина. Впервые выделен в 1986 г. в Японии из гребешков *Patinopecten yessoensis*. УТХ продуцируется водорослями – динофлагеллятами *Protoceratium reticulatum* и *Gonyaulax spinifera*. УТХ исключен из группы диарейных токсинов (окадаиновая кислота и ее аналоги – DSP-токсины), потому что, в отличие от окадаиновой кислоты, не вызывает диареи. Однако УТХ и его аналоги часто экстрагируются вместе с диарейными токсинами и дают положительные результаты в биологических тестах, проводимых на наличие диарейного яда моллюсков [1].

Химическая структура УТХ аналогична таковой структуре бреветоксинов и сигаутоксинов, которые оказывают действие на работу кальций-натриевого насоса и трансмембранных ионных каналов. Механизм, приводящий к активации фосфолипазы с помощью йессотоксина, включает начальное увеличение кальция в цитозоле клетки, доступного для кальцийзависимой фосфолипазы I типа, с последующим снижением внутриклеточной концентрации циклического аденозинмонофосфата [2, 3].

УТХ способствует активности каспаз 3 и 7 в HeLa-клетках. Он снижает порог проницаемости митохондриальных мембран в печени крыс; вызывает нарушение цитоскелета культуры клеток нейронов мозжечка и далее их апоптоз; способствует нарушению межклеточной адгезии, что, в свою очередь, может стать одной из возможных причин развития болезни Альцгеймера [4–7]; влияет на иммунную систему, способствуя повышению количества цитокинов, за счет повышения экспрессии кодирующих их генов [8]. УТХ индуцирует митотическую катастрофу и генетические изменения, которые могут представлять интерес для контроля прогрессирования опухолевого процесса [9].

Среднелетальная доза ЛД₅₀ УТХ и его аналогов в различных экспериментах, проведенных на мышах, составила от 100 до 500–750 мкг/кг [6]. На наш взгляд, разница значений токсичности для различных видов йессотоксинов зависит от особенностей их химической структуры. Безопасный уровень острого воздействия УТХ (AR₅₀) составляет 25 мкг/кг массы тела. Данные о токсичности УТХ для других видов животных практически отсутствуют [3, 6, 10]. Постановлением Европейского союза № 853/2004 в 2004 г. был установлен регламент безопасного содержания йессотоксинов в моллю-

сках – 1 мг/кг [11]. Вместе с тем результаты проводимых анализов содержания йессотоксинов в мясе моллюсков показали, что ни в одном из исследованных образцов содержание йессотоксинов не превысило 3,75 мг эквивалентов йессотоксинов/кг мяса моллюсков [6]. На этом основании был установлен новый максимально допустимый уровень содержания йессотоксинов в моллюсках – 3,75 мг/кг [12].

Таким образом, в настоящее время установлены показатели токсичности для УТХ и некоторых его аналогов, определены основные молекулы-мишени его действия, его роль в качестве промотора апоптоза, выявлен максимально допустимый уровень йессотоксинов в моллюсках. Однако, несмотря на растущее число данных о биологических эффектах, оказываемых УТХ на теплокровный организм, точный механизм его действия до сих пор неизвестен.

Целью настоящей работы явилось исследование токсичности УТХ в экспериментах *in vivo* в дозировках ниже установленного безопасного уровня острого воздействия.

Материалы и методы. Эксперимент проведен на 72 крысах-самцах линии Wistar с исходной массой тела 100 ± 10 г. Крысы получены из питомника филиала «Столбовая» ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий» ФМБА России. Животные получали сухой сбалансированный корм производства фирмы ООО «Лабораторкорм» (Россия) в режиме неограниченного доступа. Крыс размещали по 2–3 особи в клетках из поликарбоната при 12/12-часовом режиме освещенности и температуре 21 ± 1 °C. Все крысы были разделены методом случайной выборки на 12 групп численностью по 6 особей; исходная масса тела в группах не различалась ($p > 0,1$ ANOVA). Работу с животным проводили в соответствии с российскими требованиями к надлежащей лабораторной практике¹.

В работе использовали препарат УТХ производства фирмы National Research Council Canada (Канада) в виде метанольного раствора (содержание УТХ 4,3 мкмоль). Непосредственно перед проведением исследований метанол удаляли из препарата методом вакуумного выпаривания при температуре не выше +20 °C в течение не более 4 часов. Сухой остаток перерастворяли в 96 % растворе этилового спирта по ГОСТ 5962–2013². Для получения рабочих разведений токсина аликвоты спиртового раствора УТХ разбавляли стерильным апиогенным раствором 0,15 М NaCl с получением растворов концентрацией 2 мкг/кг (группы № 2, 6, 10), 8 мкг/кг (группы № 3, 7, 11) и 12 мкг/кг (группы № 4, 8, 12),

¹ Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики: Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации № 193 н от 01.04.2016 г. [Электронный ресурс] // Фармакопей.рф. – URL: <http://pharmacopoeia.ru/wp-content/uploads/2016/08/Prikaz-Minzdrava-199n-ot-01.04.2016-Ob-utverzhenii-Pravil-nadlezhashhej-Laboratornoj-praktiki.pdf> (дата обращения: 16.04.2018).

² ГОСТ 5962–2013. Спирт этиловый ректификованный из пищевого сырья. Технические условия [Электронный ресурс] // КОДЕКС: электронный фонд правовой и нормативно-технической документации. – URL: <http://docs.cntd.ru/document/1200103298> (дата обращения: 16.04.2018).

1 моль УТХ = 1187,32 г. Все испытываемые дозы – ниже установленного значения безопасного уровня острого воздействия УТХ (ARfD) – 25 $\mu\text{M}/\text{кг}$ массы тела.

Растворы, содержащие УТХ, вводили крысам указанных групп однократно в дозах 1 мл/кг массы тела внутривенно. Животным контрольных групп (№ 1, 5, 9) вводили в том же количестве физиологический раствор.

Выведение животных из эксперимента осуществляли через 6 (группы № 1–4), 24 (группы № 5–8) и 168 (группы № 9–12) часов после введения препаратов оксалаевой кислоты путем декапитации под эфирной анестезией. Собирали кровь с антикоагулянтом (трикалиевая соль ЭДТА), отбирали образцы ткани мозга для определения апоптоза и содержания малонового диальдегида, глутатиона в печени крыс. Массу внутренних органов (печень, почки, селезенка, легкие, сердце, тимус, надпочечники, гонады, мозг) определяли на электронных весах с погрешностью $\pm 0,01$ г.

Биохимические показатели сыворотки выявляли на биохимическом анализаторе Konelab 20i (Финляндия). Уровень содержания малонового диальдегида в мозге определяли оптическим методом с 2-тиобарбитуровой кислотой и измерением уровня хромогена с максимумом поглощения в красной области видимого спектра при длине волны 532 нм [13]. Содержание восстановленного глутатиона в печени крыс определяли спектрофотометрическим методом согласно [14].

Гематологические показатели определяли в цельной крови стандартными методами на гематологическом анализаторе Coulter AC TTM 5 diff OV (Beckman Coulter, США) с набором реагентов (Beckman Coulter, Франция). Апоптоз клеток мозга изучали на проточном цитофлуориметре FC 500 (Beckman Coulter International S.A., Австрия) с использованием технологии окрашивания нейронов головного мозга в суспензии флуоресцентными реагентами FITC-аннексином V и 7-аминоактиномицином (7-AAD) [15].

Статистическую обработку результатов проводили путем определения выборочного среднего, стандартной ошибки, вероятности принятия нуль-гипотезы о совпадении распределений сравниваемых выборок согласно критерию Стьюдента, Манна-Уитни и ANOVA. Различия признавали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Введение УТХ во всех указанных дозировках не вызвало признаков заболеваемости животных во всех опытных группах. Достоверного изменения массы тела животных, гонад, надпочечников, мозга не наблюдалось. Выявлено достоверное ($p < 0,05$) снижение массы селезенки, легких, тимуса (в % от массы тела) на протяжении всего времени проведения эксперимента. Наблюдалась тенденция к снижению массы сердца, почек и печени (рис. 1).

Определение гематологических показателей после введения УТХ через 168 часов выявило снижение содержания лимфоцитов ($p < 0,05$) и тенденцию увеличения количества нейтрофилов в сыворотке крови подопытных животных. Выявлено, что введение токсина во всех испытываемых дозировках вызывало повышение содержания лейкоцитов на протяжении всего времени проведения эксперимента, что доказывается различием в полученных значениях для большинства экспериментальных групп с группой контроля ($p < 0,05$) (табл. 1).

Несмотря на то что изменения параметров состава крови не носили выраженного дозозависимого характера, полученные данные свидетельствуют о возможном негативном воздействии УТХ при его внутривенном введении в количествах, которые, согласно имеющимся сообщениям, не оказывают токсического воздействия на подопытных животных.

Уровень содержания мочевины в сыворотке крови при введении всех исследуемых доз снижался немонотонно, по сравнению с контрольными группами, на протяжении всего времени эксперимента. После 6 часов введения токсина наблюдалось повышение содержания креатинина, а после 168 часов – снижение этого показателя. Выявлена тенденция к снижению содержания общего белка во всех экспериментальных группах и аланинаминотрансферазы (АЛТ) в плазме крови у крыс после 6 и 24 часов введения токсина. Полученные данные указывают на влияние УТХ на обмен белков, преобладание катаболических процессов в организме теплокровных животных, индуцируемых токсином (табл. 2).

Через 6 и 24 часа после введения УТХ наблюдалась тенденция к снижению содержания триглицеридов и достоверное повышение холестерина в сыворотке крови (табл. 2). Такая динамика свидетельствует о влиянии УТХ на обмен липидов и возможную индукцию воспалительного процесса под воздействием токсина, что подтверждает имеющиеся данные о механизме действия УТХ [5, 6].

Впервые выявлено достоверное ($p < 0,05$) дозозависимое увеличение содержания малонового диальдегида (МДА) в ткани мозга через 168 часов после введения УТХ (рис. 2) и тенденция к увеличению содержания восстановленного глутатиона в тканях печени (рис. 3). Кроме того, показано достоверное ($p < 0,1$) дозозависимое увеличение количества нейронов головного мозга с ранним апоптозом (с 2,3 % при введении 2 $\mu\text{M}/\text{кг}$ до 3,02 % клеток при введении 12 $\mu\text{M}/\text{кг}$; контроль – 1,78 % от общего количества клеток) и снижение активности позднего апоптоза (с 0,367 % при введении 2 $\mu\text{M}/\text{кг}$ до 0,180 % клеток при введении 12 $\mu\text{M}/\text{кг}$; контроль – 0,45 % от общего количества клеток), фиксируемое в течение всего периода наблюдений за животными (рис. 4).

Полученные сведения дополняют имеющиеся данные литературы, свидетельствующие о том, что УТХ является индуктором процессов катаболизма,

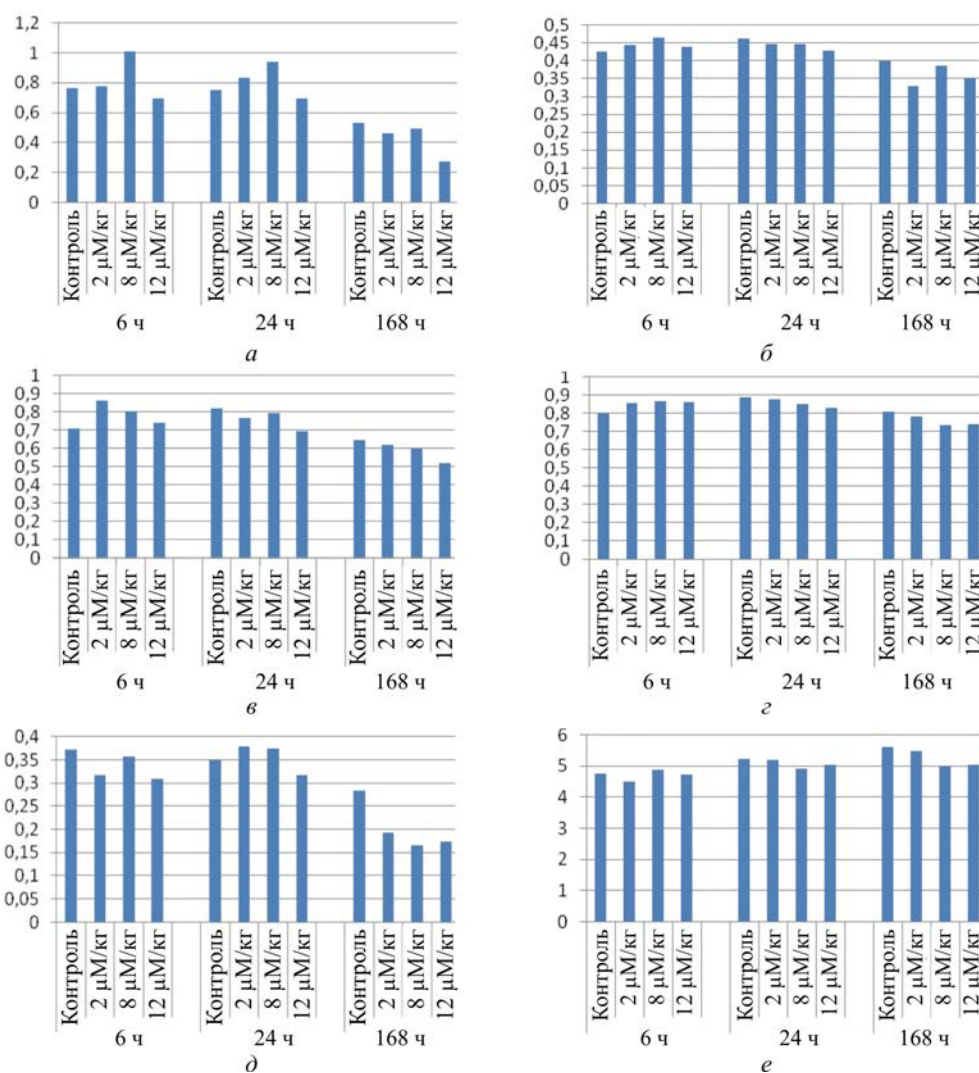


Рис. 1. Динамика изменения массы внутренних органов (в % от массы тела крыс). Ось абсцисс – доза и время введения УТХ; ось ординат – вес органа в % от массы тела крыс. Число животных в каждой группе – 6: а – селезенка; б – сердце; в – легкие; г – почки; д – тимус; е – печень

Таблица 1

Гематологические показатели (эритроциты, лейкоциты), $M \pm m$, крыс через 6, 24 и 148 ч после введения УТХ (по 6 животных в каждой группе)

Группа	Доза УТХ, мкг/кг (µM/kg)	Время после введения токсина, ч	Среднее содержание Нб в эритроците, пг	Средняя концентрация Нб в эритроците, г/л	Лейкоциты, 10^9 /л	Нейтрофилы, %	Лимфоциты, %	Моноциты, %
1	Контроль	6	$20,2 \pm 0,4$	$326,5 \pm 1,3$	$8,9 \pm 1,0$	$24,1 \pm 2,3$	$61,8 \pm 2,8$	$12,6 \pm 1,6$
2	2		$20,4 \pm 1,3$	$326,3 \pm 1,8$	$14,0 \pm 3,2$	$25,8 \pm 3$	$63,7 \pm 3,0$	$9,2 \pm 0,8$
3	8		$21,0 \pm 0,5$	$322,0 \pm 3,4$	$10,0 \pm 2,6$	$19,9 \pm 2,8$	$65,8 \pm 3,4$	$11,9 \pm 0,6$
4	12		$19,5 \pm 0,4^*$	$321,6 \pm 2,8$	$10,7 \pm 1,5^*$	$25,2 \pm 1,8$	$62,6 \pm 2,5$	$10,9 \pm 0,8^*$
5	Контроль	24	$19,7 \pm 0,3$	$325,3 \pm 2,4$	$11,2 \pm 1,5$	$23,5 \pm 3,0$	$60,8 \pm 2,6$	$12,6 \pm 1,3$
6	2		$20,7 \pm 0,3$	$324,2 \pm 3,6$	$13,9 \pm 3,6^*$	$26,8 \pm 4,6$	$60,4 \pm 6,1$	$11,7 \pm 1,7$
7	8		$20,8 \pm 0,7$	$323,8 \pm 3,1$	$13,3 \pm 2,7^*$	$26,3 \pm 4,6$	$61,6 \pm 4,5$	$11,6 \pm 0,7$
8	12		$20,3 \pm 0,3$	$326,0 \pm 3,7$	$10,5 \pm 1,1$	$23,9 \pm 3,0$	$62,6 \pm 3,2$	$12,0 \pm 1,3$
9	Контроль	168	$19,5 \pm 0,2$	$330,5 \pm 3,6$	$8,4 \pm 0,8$	$27,2 \pm 2,3$	$57,6 \pm 2,3^{**}$	$13,0 \pm 1,9$
10	2		$19,7 \pm 0,3$	$331,8 \pm 2,0$	$10,3 \pm 1,3^*$	$35,6 \pm 2,6^*$	$50,7 \pm 2,4^{**}$	$11,9 \pm 1,2$
11	8		$20,1 \pm 0,3$	$328,8 \pm 2,7$	$13,7 \pm 1,9^*$	$29,3 \pm 4,7$	$59,2 \pm 4,9^{**}$	$10,0 \pm 1,4$
12	12		$19,4 \pm 0,3$	$329,8 \pm 2,2$	$6,4 \pm 0,8$	$29,4 \pm 2,1$	$54,8 \pm 1,0^{**}$	$13,8 \pm 1,9$

Примечание: * – различие с группой контроля для данного времени достоверно, $p < 0,05$, T -тест Стьюдента и/или критерий Манна–Уитни;

** – различие между группами (6 и 168 ч после введения УТХ) для данного критерия достоверно, $p < 0,05$, T -тест Стьюдента и/или критерий Манна–Уитни.

Таблица 2

Биохимические показатели плазмы крови крыс, $M \pm m$, через 6, 24 и 168 ч после введения УТХ
(по 6 животных в каждой группе)

Группа	Доза УТХ, мкг/кг ($\mu\text{M}/\text{кг}$)	Время после введения токсина, ч	Холестерин, ммоль/л	Триглицериды, ммоль/л	АЛТ, ед/мл	АСТ, ед/мл	Белок общ, г/л	Креатинин, мкмоль/л	Мочевина, ммоль/л	Мочевая к-та, мкмоль/л
1	Контроль	6	$1,29 \pm 0,20$	$1,01 \pm 0,21$	$103,26 \pm 11,25$	$184,94 \pm 19,49$	$62,59 \pm 2,93$	$36,15 \pm 0,85$	$9,93 \pm 0,87$	$213,05 \pm 13,48$
2	2		$2,29 \pm 0,07^*$	$1,08 \pm 0,10$	$146,42 \pm 14,96^*$	$113,64 \pm 41,35$	$58,58 \pm 0,99$	$44,91 \pm 1,24^*$	$6,28 \pm 0,16^*$	$222,70 \pm 21,37$
3	8		$2,22 \pm 0,08^*$	$0,87 \pm 0,10$	$153,35 \pm 15,92^*$	$152,75 \pm 59,19$	$56,87 \pm 1,32^*$	$43,20 \pm 3,55^*$	$5,66 \pm 0,75^*$	$243,48 \pm 24,27$
4	12		$1,96 \pm 0,25^*$	$0,74 \pm 0,11^*$	$140,95 \pm 7,39^*$	$160,16 \pm 42,13$	$59,54 \pm 1,48$	$40,25 \pm 0,75^*$	$5,95 \pm 0,49^*$	$215,21 \pm 29,85$
5	Контроль	24	$1,41 \pm 0,16$	$1,01 \pm 0,25$	$101,29 \pm 9,04$	$182,80 \pm 36,41$	$62,25 \pm 3,78$	$37,66 \pm 0,95$	$10,10 \pm 1,25$	$195,11 \pm 27,61$
6	2		$2,08 \pm 0,15^*$	$0,76 \pm 0,08^*$	$137,97 \pm 16,01^*$	$300,23 \pm 30,72$	$57,53 \pm 1,20^*$	$36,36 \pm 0,60$	$5,82 \pm 0,17^*$	$108,47 \pm 11,51$
7	8		$1,99 \pm 0,11^*$	$0,89 \pm 0,08$	$104,11 \pm 7,05$	$240,16 \pm 36,03$	$54,97 \pm 1,54^*$	$37,76 \pm 0,26$	$7,73 \pm 0,30^*$	$171,84 \pm 22,86$
8	12		$2,00 \pm 0,17^*$	$0,81 \pm 0,07$	$146,54 \pm 19,2^*$	$203,70 \pm 44,27$	$58,91 \pm 1,16$	$40,65 \pm 1,44^*$	$7,79 \pm 0,31^*$	$191,54 \pm 35,40$
9	Контроль	168	$1,94 \pm 0,19$	$0,79 \pm 0,13$	$106,56 \pm 12,33$	$280,39 \pm 16,19$	$63,72 \pm 3,92$	$42,35 \pm 1,72$	$9,66 \pm 0,51$	$183,68 \pm 9,71$
10	2		$1,83 \pm 0,09$	$0,71 \pm 0,05$	$91,49 \pm 8,58$	$206,67 \pm 23,28$	$55,38 \pm 0,97^*$	$34,40 \pm 1,39^*$	$7,69 \pm 0,59^*$	$174,08 \pm 27,71$
11	8		$2,30 \pm 0,14^*$	$0,82 \pm 0,04$	$116,87 \pm 14,46$	$187,33 \pm 48,06$	$59,25 \pm 3,04$	$35,32 \pm 2,05^*$	$7,26 \pm 0,55^*$	$167,79 \pm 53,90$
12	12		$1,21 \pm 0,04$	$1,24 \pm 0,04$	$110,77 \pm 8,21$	$86,57 \pm 29,44$	$59,76 \pm 1,79$	$36,76 \pm 0,71^*$	$9,81 \pm 0,62$	$198,33 \pm 24,56$

Примечание: * – различие с группой контроля для данного времени достоверно, $p < 0,05$, T -тест Стьюдента и/или критерий Манна–Уитни.

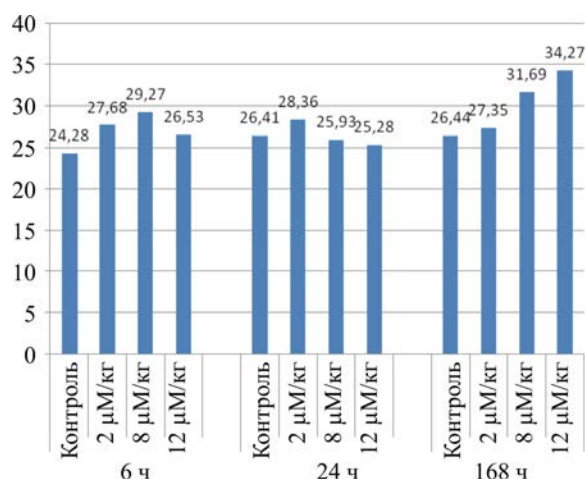


Рис. 2. Содержание МДА в ткани мозга. Ось абсцисс – доза УТХ; ось ординат – концентрация МДА в мозге, нмоль/г ткани. Число животных в каждой группе – 6

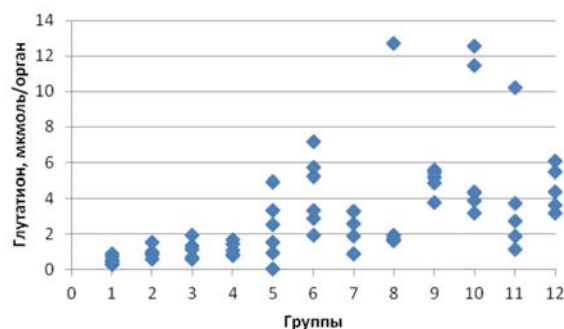


Рис. 3. Содержание восстановленного глутатиона в печени крыс

выражающихся в активации свободнорадикального окисления и апоптоза клеток головного мозга [3, 6, 10]. Впервые показано, что дозы УТХ 2; 8 и 12 $\mu\text{M}/\text{кг}$ могут оказывать токсическое воздействие на теплокровный организм.

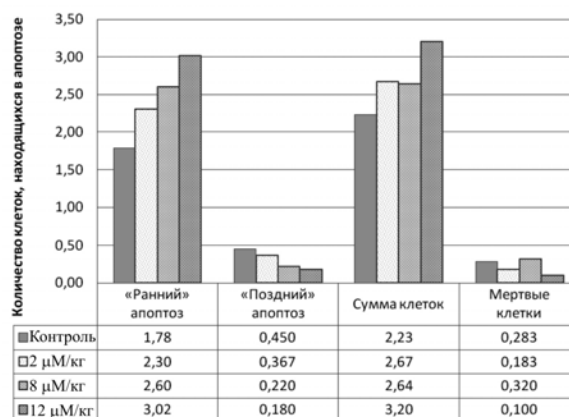


Рис. 4. Показатели апоптоза в ткани мозга (в % от общего количества нейронов в поле зрения) при введении УТХ. Полученные значения количества клеток при «раннем» и «позднем» апоптозе достоверны и имеют разнонаправленный дозозависимый характер ($p < 0,1$)

Все испытываемые дозы ниже установленного значения безопасного уровня острого воздействия УТХ ($ARfD = 25 \mu\text{M}/\text{кг}$ массы тела). Доза 2 $\mu\text{M}/\text{кг}$ соответствует допустимому уровню содержания токсина в моллюсках – 2,37 мг/кг. Полученные данные, а также данные, опубликованные в научной литературе о возможном токсическом действии УТХ в дозах ниже $ARfD$, свидетельствуют о необоснованности увеличения максимально допустимого уровня содержания йессотоксинов в моллюсках с 1,0 до 3,75 мг/кг.

Выводы. Проведенные исследования показали наличие токсических эффектов йессотоксина при его внутрибрюшинном введении на протяжении всего времени проведения эксперимента при всех дозах – 2; 8 и 12 $\mu\text{M}/\text{кг}$. Все испытываемые дозы ниже установленного значения безопасного уровня

острого воздействия YTX (ARfD), равного 25 $\mu\text{M}/\text{кг}$ массы тела. Данное действие проявлялось:

- в достоверном снижении массы селезенки, легких, тимуса (в % от массы тела) на протяжении всего времени проведения эксперимента, тенденции к снижению массы сердца, почек и печени;

- в усилении процессов катаболизма белков (снижение содержания белка, повышение количества креатинина, мочевой кислоты и АЛТ в плазме крови) и липидов (тенденция к снижению содержания триглицеридов и достоверное повышение холестерина в плазме крови) во всех экспериментальных группах;

- в усилении свободнорадикального окисления в головном мозге, выражающееся в дозозависимом росте показателей содержания малоново-

го диальдегида через 168 часов после введения токсина;

- в усилении процессов раннего апоптоза и снижении показателей позднего апоптоза в тканях головного мозга.

Полученные данные свидетельствуют о необходимости проведения дополнительных оценок рисков увеличения максимально допустимого уровня содержания йессотоксинов в моллюсках с 1,0 до 3,75 мг/кг.

Финансирование. Работа проведена за счет средств субсидии на выполнение государственного задания в рамках программы фундаментальных научных исследований (тема ФАНО России № 0529-2014-0044).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

1. Yessotoxins, a Group of Marine Polyether Toxins: an Overview / B. Paz, A.H. Daranas, M. Norte, P. Riobó, J.M. Franco, J.J. Fernández // *Mar. Drugs*. – 2008. – Vol. 6. – P. 73–102. DOI: 10.3390/md20080005
2. Yessotoxin, a novel phycotoxin, activates phosphodiesterase activity. Effect of yessotoxin on cAMP levels in human lymphocytes / A. Alfonso, L. de la Rosa, M.R. Vieytes, T. Yasumoto, L.M. Botana // *Biochem. Pharmacol.* – 2003. – Vol. 65, № 2. – P. 193–208.
3. Report of the Joint FAO/IOC/WHO ad hoc Expert Consultation on Biotoxins in Bivalve Molluscs. Oslo, Norway, 26–30 September 2004. Short Summary [Электронный ресурс]. – UNESCO, 2005. – 8 p. – URL: <http://unesdoc.unesco.org/images/0013/001394/139421e.pdf> (дата обращения: 16.04.2018).
4. Malagoli D., Ottaviani E. Yessotoxin affects fMLP-induced cell shape changes in *Mytilus galloprovincialis* immunocytes // *Cell. Biol. Int.* – 2004. – Vol. 28, № 1. – P. 57–61.
5. Alfonso A., Vieytes M.R., Botana L.M. Yessotoxin, a Promising Therapeutic Tool // *Mar. Drugs*. – 2016. – Vol. 14. – P. 30. DOI: 10.3390/md14020030
6. Marine biotoxins in shellfish – Yessotoxin group. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food chain (Question No EFSA-Q-2006-065D) [Электронный ресурс] // *The EFSA Journal*. – 2008. – Vol. 907. – P. 1–62. – URL: http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/907.pdf (дата обращения: 16.04.2018).
7. Franchini A., Malagoli D., Ottaviani E. Targets and Effects of Yessotoxin, Okadaic Acid and Palytoxin: A Differential Review // *Mar. Drugs*. – 2010. – Vol. 8. – P. 658–677. DOI: 10.3390/md8030658
8. Korsnes M.S. Apoptotic events by yessotoxin in myoblast cell lines from rat and mouse // *Toxicol. in vitro*. – 2006. – Vol. 20. – P. 1077–1087.
9. Korsnes M.S., Korsnes R. Mitotic Catastrophe in BC3H1 Cells following Yessotoxin Exposure // *Front. Cell. Dev. Biol.* – 2017. – Vol. 5, № 30. – 18 p. DOI: 10.3389/fcell.2017.00030
10. Marine biotoxins. Food and Nutrition Paper (80). – Rome: Food and agriculture organization of the united nations, 2004. – 287 p.
11. Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 [Электронный ресурс] // *Official Journal of the European Union*. – 2004. – URL: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2004:139:0055:0205:EN:PDF> (дата обращения: 16.04.2018).
12. Commission Regulation (EU) No 786/2013 of 16 August 2013 amending Annex III to Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council as regards the permitted limits of yessotoxins in live bivalve mollusks [Электронный ресурс] // *Official Journal of the European Union*. – 2013. – URL: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2013:220:0014:0014:EN:PDF> (дата обращения: 16.04.2018).
13. Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction // *Anal. Biochem.* – 1979. – Vol. 95, № 2. – P. 351–358.
14. Разыграев А.В. Метод определения глутатионпероксидазной активности с использованием пероксида водорода и 5,5'-дитиобис (2-нитробензойной кислоты) // *Клинико-лабораторный консилиум*. – 2004. – № 4. – С. 19–22.
15. Биодоступность наночастиц оксида железа при использовании их в питании. Результаты экспериментов на крысах / Р.В. Распопов, Э.Н. Трушина, И.В. Гмошинский, С.А. Хотимченко // *Вопросы питания*. – 2011. – Т. 80, № 3. – С. 25–30.

Токсичность йессотоксина в эксперименте in vivo / О.В. Багрянцева, И.В. Гмошинский, А.Д. Евстратова, Э.Н. Трушина, О.К. Мустафина, Х.С. Сото, В.А. Шипелин, А.А. Шумакова, А.Д. Панова, С.А. Хотимченко // Анализ риска здоровью. – 2018. – № 3. – С. 112–119. DOI: 10.21668/health.risk/2018.3.12

TOXICITY OF YESSOTOXIN IN EXPERIMENT *IN VIVO*

**O.V. Bagryantseva^{1,2}, I.V. Gmoshinskii¹, A.D. Evstratova¹, E.N. Trushina¹,
O.K. Mustafina¹, Kh.S. Soto¹, V.A. Shipelin¹, A.A. Shumakova¹, A.D. Panova²,
S.A. Khotimchenko^{1,2}**

¹Federal Research Center for Nutrition, Biotechnology and Food Safety, 2/14 Ust'inskiy lane, Moscow, 109240, Russian Federation

²I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Build. 2, 8 Trubetskaya Str., Moscow, 119991, Russian Federation

Yessotoxin (YTX) is a polyether. There are more than 90 known derivatives of yessotoxin. YTX was excluded from diarrhea toxins group as it, unlike okadaic acid, doesn't cause diarrhea. YTX chemical structure is similar to that of brevetoxins and ciguatoxins that influence functioning of calcium-sodium pump and trans-membrane ion channels. So, YTX can exert influence on functioning of all the organs and systems in a body. YTX is known to promote apoptosis in the cerebral tissues. Average lethal dose LD₅₀ for YTX and its analogues varied from 100 µg/kg to 500–750 µg/kg; the figures were obtained in various experiments performed on mice. Safe YTX level for acute impact (acute reference dose) amounts to 25 µM/kg of body weight.

Nowadays toxicity parameters for YTX and some of its analogues are determined; its basic action mechanisms and a role it plays in promoting apoptosis are well-known. In spite of more and more data on biological effects produced by YTX on a warm-blooded organism, experts are still unable to describe its action mechanisms precisely. Our research goal was to examine YTX toxicity in experiments in vivo in doses that were lower than the detected acute reference dose.

The experiment was performed on 72 male Wistar rats with initial body weight being equal to 100 ± 10 g. Animals were given dry balanced feedstuff produced by "Laboratoriakorm" LLC (Russia) and had free access to it. We used YTX preparation produced by "National Research Council Canada" (Canada) in our experiment; the preparation was a methanol solution (YTX content was equal to 4.3 µmol). We determined mass of internal organs, biochemical and hematological blood parameters, apoptosis of brain cells, malonic dialdehyde level in the brain and reduced glutathione in the liver.

We showed that YTX doses (2, 8 and 12 µM/kg) lower than ARfD = 2 µM/kg can exert toxic impacts on a warm-blooded organism. The obtain data prove it is necessary to additionally assess risks of an increase in maximum permissible YTX contents in shellfish from 1 mg/kg to 3.75 mg/kg.

Key words: yessotoxin, action mechanisms, in vivo, biological markers, toxicity, risk assessment, permissible level.

© Bagryantseva O.V., Gmoshinskii I.V., Evstratova A.D., Trushina E.N., Mustafina O.K., Soto Kh.S., Shipelin V.A., Shumakova A.A., Panova A.D., Khotimchenko S.A., 2018

Olga V. Bagryantseva – Doctor of Biological Sciences, Leading Researcher at Laboratory for Food Toxicology and Nanotechnologies Safety Assessment (e-mail: olga_bagryantseva@mail.ru; tel.: +7 (495) 698-54-05).

Ivan V. Gmoshinskii – Doctor of Biological Sciences, Leading Researcher at Laboratory for Food Toxicology and Nanotechnologies Safety Assessment (e-mail: gmosh@ion.ru; tel.: +7 (495) 698-53-71).

Anna D. Evstratova – Research Assistant at Laboratory for Food Toxicology and Nanotechnologies Safety Assessment (e-mail: anya.evstratova@mail.ru; tel.: +7 (495) 698-53-68).

Eleonora N. Trushina – Candidate of Medical Sciences, Head of Immunology Laboratory (e-mail: trushina@ion.ru; tel.: +7 (495) 698-53-45).

Oksana K. Mustafina – Candidate of Medical Sciences, Senior Researcher at Immunology Laboratory (e-mail: mustafina@ion.ru; tel.: +7 (495) 698-53-45).

Selada Kh. Soto – Candidate of Medical Sciences, Senior Researcher at Laboratory for Metabolic and Proteomic Analysis (e-mail: jsotoc@mail.ru; tel.: +7 (495) 698-54-07).

Vladimir A. Shipelin – Candidate of Medical Sciences, Senior Researcher at Laboratory for Food Toxicology and Nanotechnologies Safety Assessment (e-mail: v.shipelin@yandex.ru; tel.: +7 (495) 698-63-71).

Antonina A. Shumakova – Researcher at Laboratory for Food Toxicology and Nanotechnologies Safety Assessment (e-mail: antonina_sh@list.ru; tel.: +7 (495) 698-53-68).

Sergei A. Khotimchenko – Doctor of Medical Sciences, Professor, Head at Laboratory for Food Toxicology and Nanotechnologies Safety Assessment (e-mail: khotimchenko@ion.ru; tel.: +7 (495) 698-52-35).

References

1. Paz B., Daranas A.H., Norte M., Riobó P., Franco J.M., Fernández J.J. Yessotoxins, a Group of Marine Polyether Toxins: an Overview. *Mar. Drugs.*, 2008, vol. 6, pp. 73–102. DOI: 10.3390/md20080005
2. Alfonso A., de la Rosa L., Vieytes M.R., Yasumoto T., Botana L.M. Yessotoxin, a novel phycotoxin, activates phosphodiesterase activity. Effect of yessotoxin on cAMP levels in human lymphocytes. *Biochem. Pharmacol.*, 2003, vol. 65, no. 2, pp. 193–208.
3. Report of the Joint FAO/IOC/WHO ad hoc Expert Consultation on Biotoxins in Bivalve Molluscs. Oslo, Norway, 26–30 September 2004. Short Summary. UNESCO, 2005, 8 p. Available at: <http://unesdoc.unesco.org/images/0013/001394/139421e.pdf> (16.04.2018).
4. Malagoli D., Ottaviani E. Yessotoxin affects fMLP-induced cell shape changes in *Mytilus galloprovincialis* immunocytes. *Cell. Biol. Int.*, 2004, vol. 28, no. 1, pp. 57–61.
5. Alfonso A., Vieytes M.R., Botana L.M. Yessotoxin, a Promising Therapeutic Tool. *Mar. Drugs.*, 2016, vol. 14, pp. 30. DOI: 10.3390/md14020030
6. Marine biotoxins in shellfish – Yessotoxin group. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food chain (Question No EFSA-Q-2006-065D). *The EFSA Journal*, 2008, vol. 907, pp. 1–62. Available at: http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/907.pdf (16.04.2018).
7. Franchini A., Malagoli D., Ottaviani E. Targets and Effects of Yessotoxin, Okadaic Acid and Palytoxin: A Differential Review. *Mar. Drugs.*, 2010, vol. 8, pp. 658–677. DOI: 10.3390/md8030658
8. Korsnes M.S. Apoptotic events by yessotoxin in myoblast cell lines from rat and mouse. *Toxicol. in vitro*, 2006, vol. 20, pp. 1077–1087.
9. Korsnes M.S., Korsnes R. Mitotic Catastrophe in BC3H1 Cells following Yessotoxin Exposure. *Front. Cell. Dev. Biol.*, 2017, vol. 5, no. 30, 18 p. DOI: 10.3389/fcell.2017.00030
10. Marine biotoxins. Food and Nutrition Paper (80). Rome: Food and agriculture organization of the united nations, 2004, 287 p.
11. Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004. *Official Journal of the European Union*, 2004. Available at: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2004:139:0055:0205:EN:PDF> (16.04.2018).
12. Commission Regulation (EU) No 786/2013 of 16 August 2013 amending Annex III to Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council as regards the permitted limits of yessotoxins in live bivalve mollusks. *Official Journal of the European Union*, 2013. Available at: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2013:220:0014:0014:EN:PDF> (16.04.2018).
13. Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.*, 1979, vol. 95, no. 2, pp. 351–358.
14. Razygraev A.V. Metod opredeleniya glutationperoksidaznoiaktivnosti s ispol'zovaniem peroksidavodoroda i 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoinoi kisloty) [A procedure for determining glutathione peroxidase activity with hydrogen peroxide and 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)]. *Kliniko-laboratorny konsilium*, 2004, no. 4, pp. 19–22 (in Russian).
15. Raspopov R.V., Trushina E.N., Gmoshinsky I.V., Khotimchenko S.A. Biodostupnost' nanochastits oksidazhelezapri ispol'zovanii ikh v pitanii. Rezul'taty eksperimentov na kryсах [Bioavailability of nanoparticles of ferric oxide when used in nutrition. Experimental results in rats]. *Voprosy pitaniya*, 2011, vol. 80, no. 3, pp. 25–30 (in Russian).

O.V. Bagryantseva, I.V. Gmoshinskii, A.D. Evstratova, E.N. Trushina, O.K. Mustafina, Kh.S. Soto, V.A. Shipelin, A.A. Shumakova, A.D. Panova, S.A. Khotimchenko. Toxicity of yessotoxin in experiment in vivo. Health Risk Analysis, 2018, no. 3, pp. 112–119. DOI: 10.21668/health.risk/2018.3.12.eng

Получена: 08.05.2018

Принята: 20.09.2018

Опубликована: 30.09.2018