

Хрипач Л.В., Водянова М.А., Князева Т.Д., Коганова З.И., Маковецкая А.К., Савостикова О.Н., Алексеева А.В., Ушакова О.В., Мамонов Р.А., Малюгина А.В.

Показатели окислительного стресса при интраназальном введении крысам растворов противогололёдного реагента

ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» ФМБА России, 119121, Москва

Введение. Применение противогололёдных реагентов (ПГР) является эффективной мерой снижения травматизма населения, но требует совершенствования методов оценки их безопасности.

Цель исследования – изучить показатели окислительного стресса в крови крыс при апробации интраназального (и/н) пути введения растворов ПГР как одной из возможных моделей их поступления в натуральных условиях на примере жидкого ПГР хлоридной группы (22% CaCl₂; 6% NaCl).

Материал и методы. Самцам крыс Wistar (по 10 крыс в группе) ежедневно вводили в полость носа по 100 мкл растворов ПГР в концентрациях (С) 0; 0,75; 7,5 и 75 мл/л водопроводной воды. Через 5 и 28 дней после начала эксперимента определяли содержание в гемолизатах малонового диальдегида (МДА), восстановленного глутатиона (GSH), активность супероксиддисмутазы (СОД), каталазы, глутатионпероксидазы (ГПО) и глутатионредуктазы (ГР). Для регрессионного анализа зависимостей доза-эффект использовали логарифмическую трансформацию $x = \lg(C + 0,01) + 2$.

Результаты. Через 5 дней после начала опыта в гемолизатах крыс наблюдали адаптивные дозозависимые изменения активности СОД ($R = -0,504$; $p = 0,001$); ГР ($R = 0,548$; $p < 0,001$) и каталазы ($R = 0,725$; $p < 0,001$); через 28 дней – дозозависимое увеличение содержания МДА ($R = 0,617$; $p < 0,001$) и активности ГПО ($R = 0,326$; $p = 0,04$). Выявленные эффекты, по-видимому, обусловлены наличием в ПГР дополнительных компонентов (детергентов, ингибиторов коррозии и т. п.), поскольку достоверные различия с контролем найдены и при минимальной концентрации 0,75 мл/л (C_{Na^+} в 200 раз ниже, чем в физрастворе; $C_{Ca^{2+}}$ эквивалентна содержанию в сыворотке). В частности, резкое увеличение активности каталазы через 5 дней может отражать её участие в метаболизме формиатов (часто используемой противокоррозионной добавки) в условиях их введения в обход портальной вены.

Заключение. При и/н введении крысам растворов изучаемого ПГР хлоридной группы в концентрациях 0,75–75 мл/л выявлены отчётливые дозозависимые признаки компенсированного (5 дней) и декомпенсированного (28 дней) окислительного стресса, предположительно за счёт наличия в ПГР дополнительных компонентов.

К л ю ч е в ы е с л о в а: противогололёдные реагенты; крысы; интраназальное введение; кровь; окислительный стресс; малоновый диальдегид; антиоксидантные ферменты

Для цитирования: Хрипач Л.В., Водянова М.А., Князева Т.Д., Коганова З.И., Маковецкая А.К., Савостикова О.Н., Алексеева А.В., Ушакова О.В., Мамонов Р.А., Малюгина А.В. Показатели окислительного стресса при интраназальном введении крысам растворов противогололёдного реагента. Гигиена и санитария. 2020; 99 (12): 1446-1453. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2020-99-12-1446-1453>

Для корреспонденции: Хрипач Людмила Васильевна, доктор биол. наук, зав. лаб. биохимических и молекулярно-генетических методов исследования ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, 119121, Москва. E-mail: LKhripach@cspmpz.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование проведено в рамках выполнения Госзадания ФГБУ «ЦСП» ФМБА России.

Участие авторов: Хрипач Л.В. – концепция и дизайн исследования, определение биохимических показателей в пробах крови крыс, статистическая обработка, написание текста; Водянова М.А. – концепция и дизайн исследования; Князева Т.Д., Коганова З.И., Маковецкая А.К. – определение биохимических показателей в пробах крови крыс; Савостикова О.Н., Алексеева А.В., Ушакова О.В., Мамонов Р.А. – концепция и дизайн исследования, проведение токсикологического эксперимента с получением биологического материала; Малюгина А.В. – проведение токсикологического эксперимента с получением биологического материала. Все соавторы – утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи.

Поступила 18.09.2020

Принята к печати 15.12.2020

Опубликована 25.01.2021

Lyudmila V. Khripach, Mariia A. Vodyanova, Tatiana D. Knyazeva, Zoya I. Koganova, Anna K. Makovetskaya, Olga N. Savostikova, Anna V. Alekseeva, Olga V. Ushakova, Roman A. Mamonov, Anna V. Malyugina

Indices of oxidative stress under intranasal administration of deicing reagent solutions in rats

Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks of the Federal Medical Biological Agency, 119992, Moscow, Russian Federation

Introduction. The use of road deicing reagents (RDR) is an effective measure to reduce winter traumatism and requires enhancement of methods for evaluation of deicers safety.

The aim of investigation: to study markers of oxidative stress in rat blood samples during intranasal (i/n) administration of RDR solutions, as a model of intake under natural conditions, using liquid commercial RDR (22% CaCl₂; 6% NaCl).

Material and methods. Male Wistar rats (10 rats per group) were daily injected into the nasal cavity with 100 µl of RDR solutions in concentrations (C) 0; 0.75; 7.5 and 75 ml per liter of tap water. 5 and 28 days after the start of the experiment, the content of malondialdehyde (MDA), GSH, the activity of SOD, catalase, glutathione peroxidase (GPO) and glutathione reductase (GR) in the hemolysates were determined. Logarithmic transformation $x = \lg(C + 0.01) + 2$ was used for regression analysis of dose - effect relations.

Results. 5 days after the start of the experiment, adaptive dose-dependent changes in activities of SOD ($R = -0.504$; $p = 0.001$); GR ($R = 0.548$; $p < 0,001$) and catalase ($R = 0.725$; $p < 0,001$) were revealed, and after 28 days these effects were replaced by dose-dependent increase in MDA content ($R = 0.617$; $p < 0,001$) and GPO activity ($R = 0.326$; $p = 0.04$). The revealed effects, apparently, are due to the presence of additional RDR components (such as detergents, corrosion inhibitors, etc.), since significant differences with corresponding control

groups were found also during administration of 0.75 ml RDR per liter (C_{Na^+} 200 times lower than in saline solution; $C_{Ca^{2+}}$ equivalent to its serum content). In particular, sharp increase in catalase activity after 5 days may be indirect evidence of anticorrosive formates metabolism (commonly used anti-corrosive additive) in the conditions of their entry bypassing the portal vein.

Conclusion. In administration of the studied RDR solutions (0.75–75 ml/L) gave distinct dose-dependent signs of compensated (5 days) and decompensated (28 days) oxidative stress, presumably due to the presence of additional components besides of basic chlorides.

Key words: deicing reagent; rats; intranasal administration; blood; oxidative stress; malondialdehyde; antioxidant enzymes

For citation: Khripach L.V., Vodyanova M.A., Knyazeva T.D., Koganova Z.I., Makovetskaya A.K., Savostikova O.N., Alekseeva A.V., Ushakova O.V., Mamonov R.A., Malyugina A.V. Indices of oxidative stress under intranasal administration of deicing reagent solutions in rats. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian Journal)*. 2020; 99 (12): 1446–1453. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2020-99-12-1446-1453> (In Russ.)

For correspondence: Ludmila V. Khripach, MD, Ph.D., DSci., Head of the laboratory of biochemical and molecular genetics methods, Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks of the Federal Medical Biological Agency, 119992, Moscow, Russian Federation. E-mail: LKhripach@cspmpz.ru

Information about the authors:

Khripach L.V., <https://orcid.org/0000-0003-0170-3085>; Vodyanova M.A., <https://orcid.org/0000-0003-3350-5753>
Knyazeva T.D., <https://orcid.org/0000-0001-5279-5018>; Makovetskaya A.K., <https://orcid.org/0000-0002-4652-1755>
Koganova Z.I., <https://orcid.org/0000-0002-4622-8110>; Savostikova O.N., <https://orcid.org/0000-0002-7032-1366>
Alekseeva A.V., <https://orcid.org/0000-0002-0422-8382>; Ushakova O.V., <https://orcid.org/0000-0003-2275-9010>
Mamonov R.A., <https://orcid.org/0000-0002-6540-6015>; Malyugina A.V., <https://orcid.org/0000-0003-3930-0265>

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgment. The study was carried out as part of the implementation of the State Assignment of the Center for Strategic Planning.

Contribution: Khripach L.V. – research concept and design, determination of biochemical parameters in rat blood samples, statistical processing, writing a text; Vodyanova M.A. – research concept and design; Knyazeva T.D., Koganova Z.I., Makovetskaya A.K. – determination of biochemical parameters in rat blood samples; Savostikova O.N., Alekseeva A.V., Ushakova O.V., Mamonov R.A. – research concept and design, conducting a toxicological experiment with obtaining biological material; Malyugina A.V. – conducting a toxicological experiment with obtaining biological material. All co-authors – approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article.

Received: September 18, 2020

Accepted: December 15, 2020

Published: January 25, 2021

Введение

Гололёдный травматизм – одна из существенных причин временной нетрудоспособности населения России и других северных стран [1–6]. В группах повышенного риска, среди лиц с возрастным остеопорозом этот вид травматизма может приводить к тяжёлым повреждениям и инвалидности [4, 7, 8]. В российских городах с населением от 500 тыс. до 1,5 млн человек в среднем за зиму получают травмы из-за гололёда около 7000 человек; моделирование соответствующего экономического ущерба на примере четырёх городов средней полосы России показывает, что на федеральном уровне потенциальный негативный макроэкономический эффект от гололёдного травматизма составляет более 30 млрд руб. в год [1].

Применение противогололёдных реагентов (ПГР) является эффективной профилактической мерой снижения зимнего травматизма населения – как за счёт предотвращения автомобильных аварий, так и за счёт уменьшения последствий падения пешеходов на обледенелых тротуарах. В то же время регулярное использование ПГР, как и многие виды хозяйственной деятельности человека, оказывает негативное воздействие на окружающую среду, приводя к уже доказанным негативным эффектам (засолению и деградации почв, обеднению растительного покрова, ускоренной коррозии металлических частей автомобилей, сокращению срока службы шин и зимней обуви и т. д.) и потенциально обладая способностью влиять на состояние здоровья населения. Поэтому одной из важных современных задач гигиены является совершенствование методов оценки безопасности ПГР, ассортимент которых постоянно увеличивается.

Современные ПГР являются многокомпонентными препаратами на основе растворимых солей щёлочноземельных металлов, способных предупреждать образование льда при предельных температурах воздуха от -11 °C (хлорид натрия) до -56 °C (ацетат калия), и включают различные добавки (противокоррозионные, биофильные, антислеживающие и т. п.) [9–12]. В частности, ингибитор коррозии в запатентованном жидком ПГР на основе хлорида кальция [12] состоит из пяти веществ (карбамид, нитрит натрия, гексаметафосфат натрия и два детергента). При использовании технических солей, а также при добавлении фрикционных материалов (мраморной или гранитной крошки, песка, щебня и т. п.) ПГР

могут содержать примеси тяжёлых металлов и других компонентов горных пород и промышленных реакционных смесей.

В настоящее время существует обширный круг литературных данных по изучению токсичности ПГР и их компонентов для растений и водных организмов различных уровней организации – от бактерий до позвоночных. Эксперименты на лабораторных животных проводятся значительно реже и принадлежат в основном отечественным исследователям [13–19]. Получены данные по острой токсичности ряда коммерческих препаратов ПГР (Chevron IBG, ХКМ, ХКНМ, МПМ, Бишофит, Нордикс и др.) при пероральном и ингаляционном путях введения мышам и крысам [13, 17, 18], оценивалось раздражающее действие препаратов на кожные покровы крыс и слизистую оболочку глаз кроликов или морских свинок [13, 17–19], а также их сенсибилизирующее действие при повторных аппликациях на кожу морских свинок [13, 15, 19] или при внутрикожном введении мышам в полном адьюванте Фрейнда [17, 18]. Проведено изучение подострой токсичности трёх ПГР (ХКМ, Бишофит, Нордикс-П) при внутрижелудочном введении крысам с использованием ряда биохимических и цитоморфологических показателей состояния организма [14, 15].

Целью настоящего исследования является изучение показателей окислительного стресса в крови крыс при апробации интраназального введения животным растворов ПГР на примере одного из коммерческих ПГР хлоридной группы. Показатели окислительного стресса являются ранними маркерами реакции организма на воздействие повреждающих факторов, в том числе и химических веществ.

В гигиенических экспериментах на животных интраназальный путь введения используется редко, хотя во многих случаях, в том числе и в случае ПГР, полость носа человека является одним из потенциальных входных ворот для аэрозолей изучаемых препаратов в природных условиях.

Материал и методы

Эксперимент проводили на самцах крыс линии Wistar, полученных из Филиала «Андреевка» ФГБУН «НЦБМТ» ФМБА России, с исходной массой тела 200–220 г в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспери-

Таблица 1

Концентрации CaCl₂ и NaCl в рабочих растворах, вводимых крысам ежедневно в течение 5 и 28 дней (интраназально, в объёме 100 мкл на каждое введение)

Компонент ПГР	Исходный ПГР, %	Рабочий раствор ПГР					
		75 мл/л		7,5 мл/л		0,75 мл/л	
		концентрация, %	доза, мг/кг/день	концентрация, %	доза, мг/кг/день	концентрация, %	доза, мг/кг/день
CaCl ₂	22	1,65	8,25	0,165	0,825	0,017	0,085
NaCl	6	0,45	2,25	0,045	0,225	0,005	0,025

ментальных и иных целей. Крысы содержали при естественном освещении в условиях свободного доступа к гранулированному корму и питьевой воде.

В работе использовали жидкий ПГР хлоридной подгруппы, содержащий 22% хлористого кальция и 6% хлористого натрия. Рабочие растворы для интраназального введения животным содержали 0,75; 7,5 и 75 мл исходного коммерческого препарата на литр водопроводной воды (табл. 1). Интраназальное введение рабочих растворов крысам проводили ежедневно в объёме 100 мкл в положении лёжа на спине без использования наркоза; контрольным животным вводили эквивалентное количество воды. Каждая экспериментальная группа включала 10 животных.

На 5-е и 28-е сутки эксперимента в лизатах цельной крови подопытных крыс определяли содержание малонового диальдегида (продукта перекисного окисления липидов), восстановленного глутатиона (основного компонента ферментативного звена антиоксидантной защитной системы клеток) и активность нижеперечисленных 4 антиоксидантных ферментов.

Содержание малонового диальдегида (МДА) определяли по образованию окрашенного комплекса с тиобарбитуровой кислотой [20]; содержание восстановленного глутатиона

(GSH) – по образованию комплекса с реагентом Элмана [21]; активность супероксиддисмутазы (SOD) – по ингибированию скорости аутоокисления адреналина [22]; активность каталазы (CAT) – по образованию комплекса перекиси водорода с молибденовокислым аммонием [23]; активность глутатионпероксидазы (GPx) – по скорости восстановления гидроперекиси трет-бутила в присутствии сопряжённой системы НАДФН-глутатионредуктазы [24]; активность глутатионредуктазы (GR) – методом Хорна в модификации Панченко и Герасимова [25].

Математический анализ полученных данных проводили с помощью компьютерной программы Statistica v. 7.0. Для оценки достоверности межгрупповых различий показателей использовали параметрический *t*-тест Стьюдента, для оценки зависимостей доза-эффект – линейный регрессионный анализ.

Результаты

В табл. 2 приведены среднегрупповые значения изучавшихся биохимических показателей через 5 и 28 дней после начала эксперимента при интраназальном введении крысам растворов ПГР с указанием достоверности различий

Таблица 2

Показатели окислительного стресса в гемолизатах крыс Wistar при ежедневном интраназальном введении животным растворов ПГР в разных концентрациях

Концентрация ПГР в рабочих растворах	SOD, мкмоль/мин/мл	CAT, мKat/л	GPx, мкмоль/мин/мл	GR, мкмоль/л/час	GSH, мкмоль/л	MDA, нмоль/мл
<i>Через 5 дней после начала эксперимента</i>						
Контроль	7,4 ± 0,4	5,6 ± 0,4	38,2 ± 3,3	16,7 ± 1,8	454 ± 56	20,6 ± 1,4
0,75 мл/л	6,5 ± 0,6 <i>p</i> = 0,214	8,8 ± 0,4 ↑ <i>p</i> = 0,00002	37,6 ± 3,0 <i>p</i> = 0,879	22,3 ± 1,1 ↑ <i>p</i> = 0,014	461 ± 29 <i>p</i> = 0,914	21,1 ± 0,8 <i>p</i> = 0,718
7,5 мл/л	6,0 ± 0,8 <i>p</i> = 0,134	9,4 ± 0,3 ↑ <i>p</i> = 5 · 10 ⁻⁷	37,5 ± 2,4 <i>p</i> = 0,854	20,0 ± 1,3 <i>p</i> = 0,158	436 ± 11 <i>p</i> = 0,790	21,7 ± 1,2 <i>p</i> = 0,531
75 мл/л	4,2 ± 0,6 ↓ <i>p</i> = 0,0006	9,2 ± 0,4 ↑ <i>p</i> = 8 · 10 ⁻⁶	30,1 ± 2,7 <i>p</i> = 0,070	25,8 ± 1,1 ↑ <i>p</i> = 0,0004	446 ± 17 <i>p</i> = 0,878	23,1 ± 1,3 <i>p</i> = 0,160
Линейное уравнение доза-эффект	<i>y</i> = -0,78 <i>x</i> + 7,71 <i>R</i> = -0,504 <i>p</i> = 0,001	<i>y</i> = 0,98 <i>x</i> + 6,15 <i>R</i> = 0,725 <i>p</i> = 2 · 10 ⁻⁷	<i>p</i> = 0,087	<i>y</i> = 1,99 <i>x</i> + 16,90 <i>R</i> = 0,548 <i>p</i> = 0,0003	<i>p</i> = 0,734	<i>p</i> = 0,122
<i>Через 28 дней после начала эксперимента</i>						
Контроль	6,9 ± 0,5	9,4 ± 0,1	27,3 ± 2,8	19,3 ± 0,8	390 ± 22	22,2 ± 1,3
0,75 мл/л	6,8 ± 0,4 <i>p</i> = 0,873	9,1 ± 0,2 <i>p</i> = 0,197	29,9 ± 2,7 <i>p</i> = 0,523	23,1 ± 1,1 ↑ <i>p</i> = 0,01*	381 ± 19 <i>p</i> = 0,772	28,1 ± 1,6 ↑ <i>p</i> = 0,01
7,5 мл/л	6,7 ± 0,4 <i>p</i> = 0,796	9,4 ± 0,1 <i>p</i> = 0,570	31,1 ± 1,4 <i>p</i> = 0,243	20,5 ± 1,1 <i>p</i> = 0,405	404 ± 22 <i>p</i> = 0,654	30,3 ± 1,8 ↑ <i>p</i> = 0,002
75 мл/л	7,1 ± 0,4 <i>p</i> = 0,746	9,2 ± 0,1 <i>p</i> = 0,064	34,1 ± 1,9 <i>p</i> = 0,062	19,3 ± 1,0 <i>p</i> = 0,992	400 ± 28 <i>p</i> = 0,786	31,6 ± 1,2 ↑ <i>p</i> = 0,00005
Линейное уравнение доза-эффект	<i>p</i> = 0,829	<i>p</i> = 0,442	<i>y</i> = 1,66 <i>x</i> + 27,02 <i>R</i> = 0,326 <i>p</i> = 0,040	<i>p</i> = 0,938 (подъём-спад)	<i>p</i> = 0,650	<i>y</i> = 2,48 <i>x</i> + 22,72 <i>R</i> = 0,617 <i>p</i> = 0,00002

Примечание. Данные представлены в виде средних значений ± среднеквадратичная ошибка; *n* = 10 для всех групп животных. Достоверность межгрупповых различий показателей по отношению к соответствующей контрольной группе животных рассчитывалась в *t*-тесте Стьюдента.

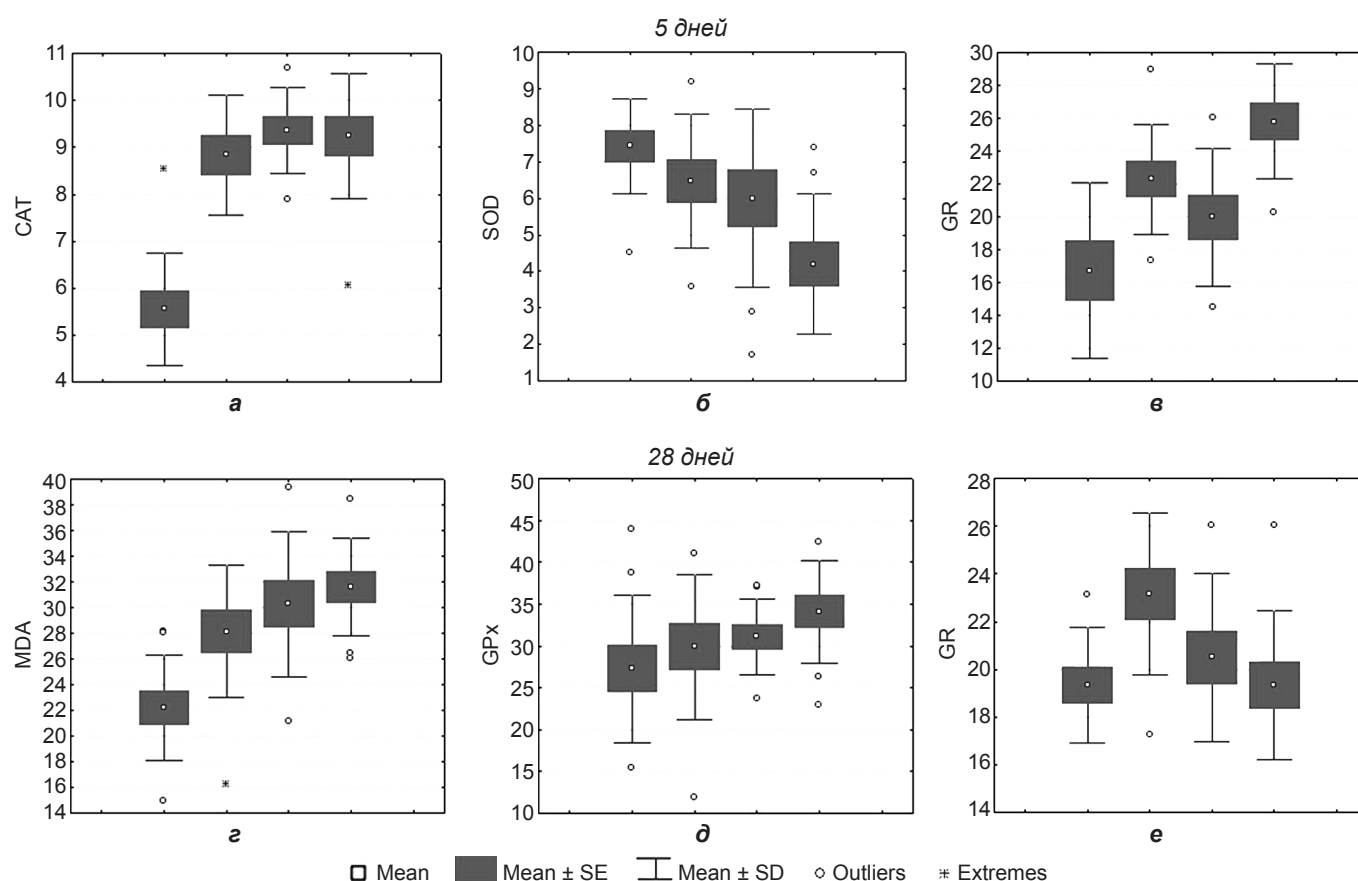


Рис. 1. Показатели окислительного стресса в гемолизатах крыс Wistar при ежедневном интраназальном введении животным растворов ПГР в концентрациях (слева направо): 0; 0,75; 7,5 и 75 мл/л воды в течение 5 (а–в) и 28 (г–е) дней.

по отношению к соответствующим контрольным группам крыс. На рис. 1 часть этих данных представлена графически с отображением средних значений и оценок дисперсии (SE, SD).

Кроме того, в двух отдельных строках табл. 2 показаны результаты линейного регрессионного анализа зависимостей доза-эффект с использованием индивидуальных значений показателей для всех групп животных на данный срок эксперимента ($n = 40$).

Поскольку концентрации ПГР в рабочих растворах взяты с шагом 10, для регрессионного анализа использовали логарифмическую трансформацию $x = \lg(C + 0,01) + 2$, где C – концентрация ПГР в мл/л. Добавление к C небольшой величины (в данном случае 0,01) является стандартным приёмом для того, чтобы при логарифмировании предиктора не утратилась начальная точка $C = 0$. Последний шаг трансформации $\lg(C + 0,01) + 2$ опциональный и предпринят для того, чтобы на точечных графиках вся зависимость находилась при значениях $x > 0$ и не пересекалась осью ординат. Некоторые из этих зависимостей показаны на рис. 2.

Как следует из представленных данных, достоверные изменения показателей окислительного стресса под влиянием введения животным растворов ПГР выявлены в обеих временных точках эксперимента.

Через 5 дней после начала опыта в пробах крови подопытных крыс наблюдали адаптивные изменения активности антиоксидантных ферментов – по мере увеличения концентрации ПГР в рабочих растворах активности CAT и GR увеличивались, активность SOD снижалась. Дозозависимое снижение активности SOD полностью соответствовало линейной аппроксимации (см. рис. 2, а); увеличение

активности CAT более точно описывалось полиномом 2-й степени (см. рис. 2, г), но расположение индивидуальных значений позволяло получить и достоверное линейное уравнение (см. рис. 2, в; $R = 0,725$; $p < 0,001$). Содержание ключевых метаболитов системы окислительного равновесия тканей (GSH и MDA) сохранялось на уровне контрольных значений.

Через 28 дней после начала эксперимента, напротив, основным наблюдавшимся изменением являлось дозозависимое увеличение содержания в крови крыс MDA – продукта перекисного окисления липидов (см. рис. 2, в и 3, в; $R = 0,617$; $p < 0,001$). Параллельное увеличение активности GPx – фермента, восстанавливающего гидроперекиси липидов с расходом защитного пула GSH, – также свидетельствует о том, что центром событий в этой экспериментальной точке является окислительный стресс в мембранах клеток крови, представленных в основном эритроцитами. Активность GR на этот срок эксперимента имела дозозависимую «подъём-спад» с достоверно отличающимся от контроля максимумом при концентрации ПГР 0,75 мл/л; содержание восстановленного глутатиона не изменялось.

Следует отметить, что признаки дозозависимого увеличения MDA в пробах крови подопытных крыс наблюдали и на 5-й день после начала эксперимента (рис. 3, а и близкие к достоверным изменениям в табл. 2), но они удерживались в границах нормы системой ферментов антиоксидантной защиты. Разнонаправленные изменения активностей SOD и CAT, по-видимому, свидетельствуют о том, что механизмы адаптации клеток крови к развивающемуся окислительному стрессу направлены на перестройку пула образующихся ак-

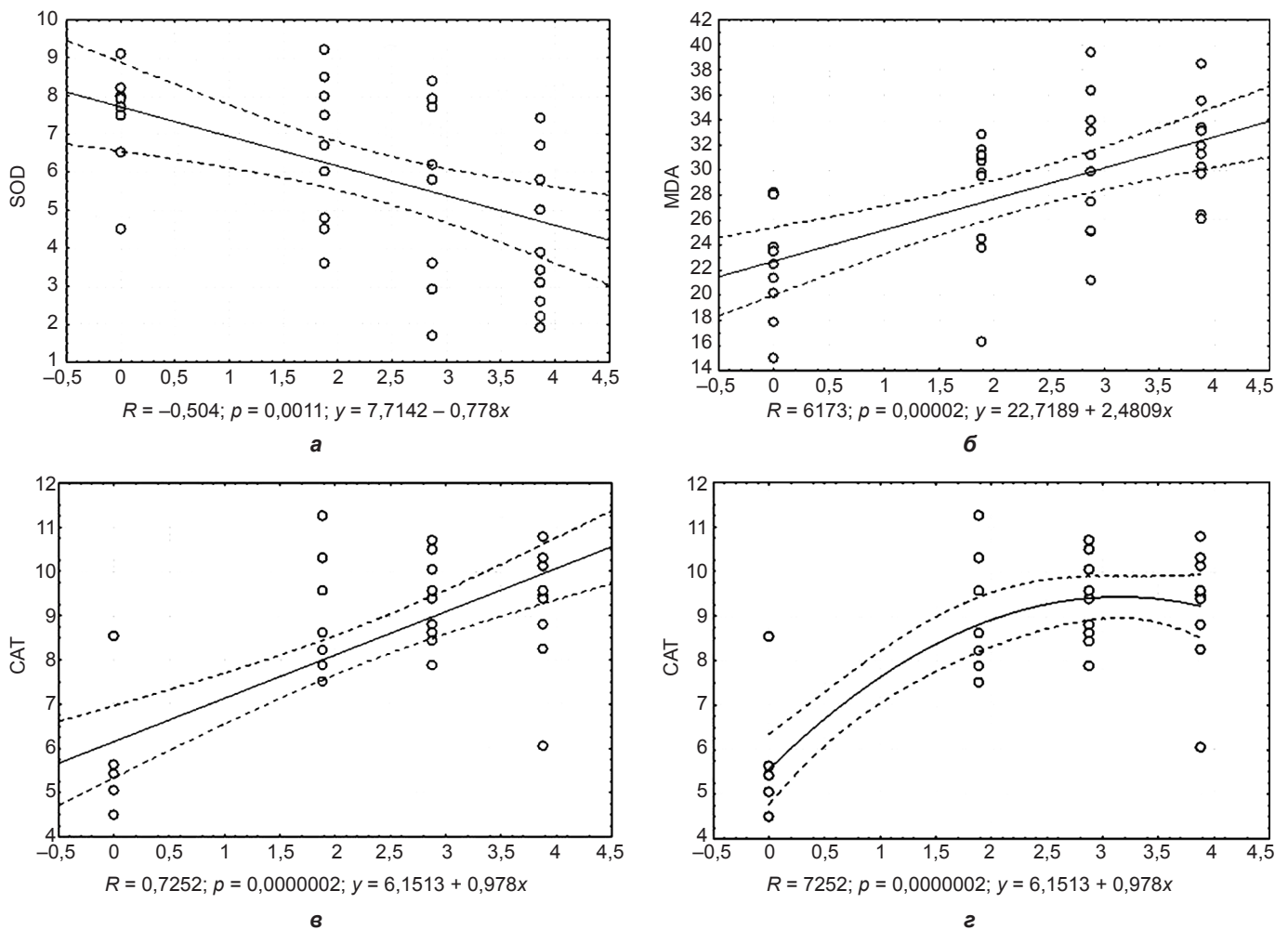


Рис. 2. Линейная (а-в) и полиномиальная (г) аппроксимация зависимостей доза-эффект: а, в, г – 5 дней; б – 28 дней. $n = 10$ для каждой экспериментальной группы крыс (некоторые точки на графиках накладываются).

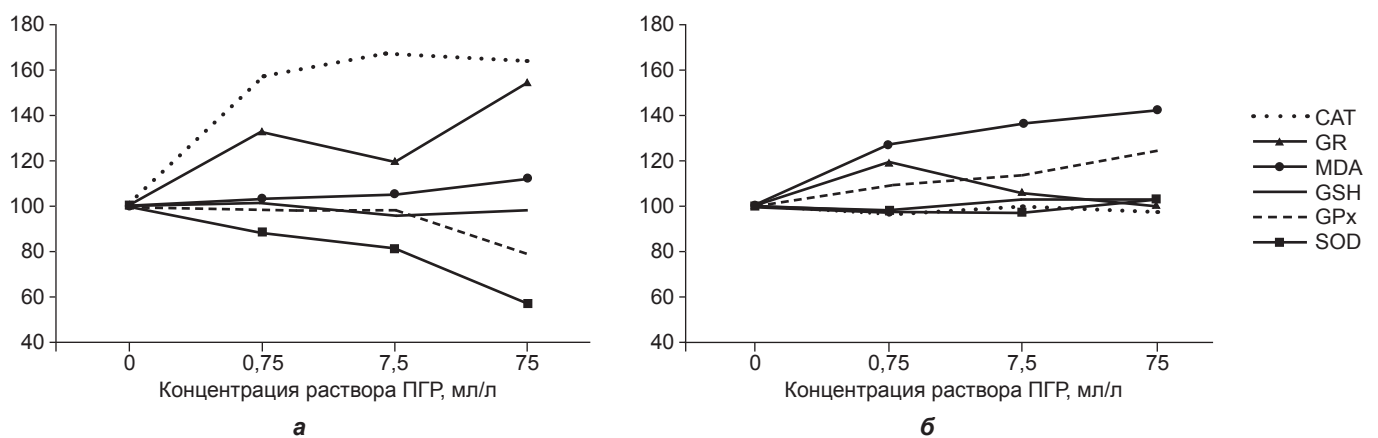


Рис. 3. Показатели окислительного стресса в % от соответствующих контрольных значений через 5 (а) и 28 (б) дней после начала введения крысам растворов ПГР.

тивных форм кислорода в сторону увеличения концентрации супероксид анион-радикала (сигнальной молекулы с низкой деструкционной способностью) и снижение концентрации перекиси водорода (эндогенного окислителя и источника образования гидроксильного радикала). Основной блок при этом стоит на пути SOD, предотвращая переход $\cdot O_2^- \rightarrow H_2O_2$; часть уже образовавшейся перекиси водорода разрушается каталазой.

Обсуждение

В экспериментальной биологии интраназальный путь введения препаратов лабораторным животным широкого распространения не получил за исключением двух областей – разработки мукозальных вакцин [26, 27] и лабораторных моделей инсульта и некоторых других заболеваний ЦНС [28, 29]. Введение низкомолекулярных веществ и

небольших регуляторных пептидов в полость носа людей и лабораторных животных позволяет как снижать скорость их метаболической трансформации в печени [30], так и частично обходить гематоэнцефалический барьер [31–33], что в настоящее время активно используется при поиске новых лекарственных средств для адресной защиты и восстановления клеток головного мозга. В общем случае преимуществом интраназального пути введения является крайне высокая васкуляризация слизистой оболочки полости носа, обеспечивающая быстрое поступление введённых веществ в системный кровоток и через него – в различные ткани организма.

В то же время в зависимости от наличия в препаратах химических соединений с раздражающим действием возможны и местные эффекты повреждения слизистой оболочки полости носа.

Оба компонента изучавшегося авторами ПГР потенциально обладают способностью вызывать раздражение кожи и слизистых оболочек полости носа и глаз [34]. Однако, как это видно из табл. 1, в рамках данного эксперимента хлористый натрий не может рассматриваться как возможный повреждающий фактор, поскольку его концентрации в рабочих растворах были примерно в 2–200 раз ниже, чем в физиологическом растворе (0,85%).

Напротив, диапазон концентраций CaCl_2 в рабочих растворах перекрывал область от физиологического значения 0,017% (1,5 мМ), близкого к содержанию ионизированного кальция в сыворотке людей и животных, до величины 1,65%, которая всего в несколько раз ниже концентраций хлорида кальция в инъекционных лекарственных формах (5–10%). Клиницистами описаны случаи образования подкожных кальцификатов (лат. термин *calcinosis cutis*) и участков некроза кожи при внутривенном введении хлорида кальция пациентам с гипокальциемией, ослабленным основным тяжёлым заболеванием (злокачественные новообразования, цирроз печени, терминальная стадия ХПН и др.). Механизмом этих побочных эффектов является образование в подкожной соединительной ткани нерастворимых солей кальция, преимущественно в виде гидроксиапатита $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, с последующей реакцией ретикулоэндотелиальных клеток на образовавшиеся конгломераты [35–37].

Следует отметить, что во время эксперимента животных тщательно осматривали, и даже при введении растворов ПГР с максимальной концентрацией CaCl_2 (1,65%) в течение 28 дней не наблюдались признаки повреждения тканей вокруг места введения препарата или каких-либо изменений в поведении животных, которые могли бы свидетельствовать о раздражении слизистой оболочки полости носа. По аналогии с вышеописанным механизмом развития *calcinosis cutis* можно предположить, что всасывание хлорида кальция через слизистую оболочку полости носа крыс могло бы приводить к образованию гидроксиапатита в виде нано- или микрочастиц, которые не накапливались в тонкой и хорошо васкуляризованной подслизистой оболочке, а захватывались локальными фагоцитами или поступали в кровоток. Такой механизм мог бы объяснить развитие окислительного стресса в результате активации НАДФН-оксидазы локальных фагоцитов и фагоцитов крови, а также отсутствие местной воспалительной реакции на инородные тела, превышающие размеры фагоцитов. Можно даже усилить эту позицию, предположив, что использование в качестве растворителя водопроводной воды, которая всегда содержит определённое количество солей железа, приводило к образованию легированных гидроксиапатитов (англ. термин Fe-doped hydroxapatite), синтезированных в настоящее время биотехнологиями и обладающих собственной прооксидантной активностью [38–40]. Но даже и в этом случае необъяснимыми останутся достоверные изменения показателей окислительного стресса у крыс, которым вво-

дили растворы ПГР с близкой к физиологической концентрацией CaCl_2 – 0,017% (см. табл. 1).

Единственное формально близкое исследование Patel и соавт. [41] с однократным интраназальным введением мышам стерильных растворов хлорида кальция тоже не даёт возможности объяснить полученные нами результаты, поскольку наблюдавшиеся гистологические признаки бронхопневмонии являлись закономерным следствием введения препарата под наркозом [42], а полное отсутствие изменений стандартных клинико-лабораторных показателей свидетельствовало только о том, что их набор не отражал патогенеза повреждения лёгочной ткани.

С учётом вышеизложенного наиболее вероятным объяснением полученных нами результатов является токсическое действие какого-то недокументированного компонента изучавшегося препарата ПГР (антикоррозийной добавки, стабилизатора, антислеживающего агента и т. п.) или нескольких таких компонентов.

С этой точки зрения интересно, что резкое увеличение активности каталазы во всех экспериментальных группах крыс через 5 дней после начала опыта может оказаться косвенным указанием на воздействие формиатов – солей муравьиной кислоты, которые часто используются как противокоррозионные добавки [43]. При отравлении людей метанолом именно накопление муравьиной кислоты на фоне типичной для приматов недостаточности тетрагидрофолатной системы печени вызывает повреждение почек и зрительного нерва. Пероксидазная активность каталазы является дополнительным путём детоксикации формиатов, который у малочувствительных к метанолу грызунов выявляется только при подавлении мощного основного пути ингибиторами или нокаутом 10-формилтетрагидрофолат-дегидрогеназы [44–46]. Поэтому не исключена вероятность, что разнонаправленные изменения каталазы и SOD на раннем сроке эксперимента отражают не особенности кооперации антиоксидантных ферментов, как это предполагалось в разделе «Результаты», а участие каталазы в детоксикации формиатов в условиях их введения в обход портальной вены печени. С точки зрения цели данной работы важным является только то, что формиаты – один из кандидатов на роль недокументированного токсичного компонента изучавшегося ПГР. Однако вышеописанные данные могут оказаться полезными и для токсикологов, разрабатывающих лабораторные модели отравления людей метанолом на резистентных к этому веществу грызунах – в том смысле, что пероральное введение формиатов нокаутным мышам может оказаться равноценным интраназальному введению обычным мышам.

Результаты проведённого исследования свидетельствуют о том, что при изучении токсичности коммерческих ПГР на животных и других тест-объектах целесообразно использовать дополнительные экспериментальные группы, подвергая их воздействию эквивалентных смесей известных компонентов в виде химически чистых солей. Мы при этом не сможем идентифицировать действующее вещество, но будем знать, что токсичность препарата (или такая-то часть его токсичности) определяется недокументированными примесями.

Заключение

При интраназальном введении крысам растворов изучаемого ПГР в концентрациях 0,75–75 мЛ/л выявлены отчётливые дозозависимые признаки развития окислительного стресса с двумя классическими стадиями компенсированного и декомпенсированного нарушения оксидантного равновесия организма. Суммарная токсичность препарата, по-видимому, определяется воздействием не основных компонентов (хлоридов), а недокументированных дополнительных ингредиентов, введённых с целью улучшения технологических свойств.

Литература

(п.п. 4–7, 13, 20–22, 26, 28–42, 44–46 см. References)

1. Сосенкина И.М., Осокин Н.А., Климентова А.Ю. Экономические последствия гололедного травматизма в регионах РФ. *Стратегические решения и риск-менеджмент*. 2019; 10(1): 58–69. <https://doi.org/10.17747/2618-947X-019-1-58-69>
2. Шац М.М., Скачков Ю.Б., Черепанова А.П. Уличный травматизм г. Якутска как производная состояния дорожных систем. *Якутский медицинский журнал*. 2017; 59(3): 113–6.
3. Девяткова Г.И., Мchedlishvili А.А., Шепеткова Е.Р. Анализ показателей травматизма, связанного с управляемой причиной (гололед) на примере крупного краевого центра (город Пермь). *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2018; (11): 267–71.
4. Сафонова Ю.А., Зоткин Е.Г., Торопцова Н.В. Диагностика риска и профилактика падений: проект клинических рекомендаций Ассоциации ревматологов России и Российской ассоциации по остеопорозу. *Научно-практическая ревматология*. 2020; 58(2): 133–9. <https://doi.org/10.14412/1995-4484-2020-133-139>
5. Никитин А.А. Противогололедные материалы. В поисках компромисса. *Башкирский экологический вестник*. 2013; (3–4): 33–5.
6. Аржанухина С.П., Гарибов Р.Б., Кочетков А.В., Янковский Л.В., Глухов Т.А., Бобков А.В. Выбор требований к противогололедным материалам для зимнего содержания автомобильных дорог мегаполиса. *Вода: химия и экология*. 2013; 58(4): 106–15.
7. Андрейчатенко В.В., Вандышев С.А., Зотиков В.С., Примаков А.А., Ребристая А.П., Родин А.А. Состав антигололедного реагента. Патент РФ № 2259383 С1; 2005.
8. Ачкеева М.В., Морозов И.В., Романюк Н.В., Шаршков В.В. Способ предотвращения или ликвидация скользкости дорожного покрытия, способ приготовления указанного жидкого антигололедного реагента и технологическая линия для его приготовления. Патент РФ № 2352709 С2; 2009.
9. Русаков Н.В., Мухамбетова Л.Х., Крятов И.А., Коганова З.И., Фадеева И.И., Чудакова С.Б. и соавт. Оценка степени опасности химических веществ, загрязняющих почву, при воздействии на организм экспериментальных животных. *Гигиена и санитария*. 2007; 85(2): 68–70.
10. Чудакова С.Б. *Токсиколого-гигиеническая оценка степени опасности антигололедных реагентов*: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. М.; 2006.
11. Крятов И.А., Тонкопий Н.И., Водянова М.А., Русаков Н.В., Доне-рьян Л.Г., Евсеева И.С. и соавт. Методические подходы к обоснованию гигиенических требований к применению противогололедных материалов. *Гигиена и санитария*. 2014; 93(6): 52–4.
12. Аликбаева Л.А., Мокроусова О.Н., Меркурьева М.А., Бек А.В., Садченко В.Ю. Токсиколого-гигиеническая характеристика хлор-содержащих противогололедных материалов. *Профилактическая медицина*. 2014; (4): 25–9.
13. Аликбаева Л.А., Золотарева А.А., Бек А.В., Рыжков А.Л. Токсиколого-гигиеническая оценка твердых химических противогололедных материалов. *Профилактическая и клиническая медицина*. 2019; (1): 22–7.
14. Водянова М.А., Крятов И.А., Чудакова С.Б., Ушакова О.В., Евсеева И.С., Маковецкая А.К. и соавт. Оценка аллергенного, иммуногенного и кожно-раздражающего действия антигололедных реагентов на организм теплокровных животных. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2019; 167(5): 599–603.
15. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы. *Лабораторное дело*. 1988; (4): 44–7.
16. Арутунян А.В., Дубинина Е.Е., Зыбина Н.Н. *Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма*. СПб.: Фолиант; 2000.
17. Сидоренко Г.И., Меркурьева Р.В., ред. *Методические указания к оценке биохимических, морфологических, иммунологических и физиологических показателей ранних изменений функциональных реакций человека при воздействии факторов окружающей среды*. М.-Пермь; 1986: 32–3.
18. Синяшина Л.Н., Сёмин Е.Г., Медкова А.Ю., Сяндюкова Р.А., Кара-таев Г.И. Доклиническое исследование токсичности и безопасности канклиной живой коклюшной вакцины интраназального применения. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2018; 17(6): 98–108. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2018-17-6-98-108>
19. Розов С.Ю., Паткина И.А., Розов Ю.Н., Шестаченко А.Ю. Использование солей муравьиной кислоты для улучшения свойств противогололедных материалов. *Eur. J. Analyt. Appl. Chem.* 2017; (1): 21–30. <https://doi.org/10.20534/EJAAC-17-1-21-30>

References

1. Sosenkina I.M., Osokin N.A., Klimentova A.Yu. Economic impact of ice and snow related injuries in Russian regions. *Strategicheskie resheniya i risk-menedzhment*. 2019; 10(1): 58–69. <https://doi.org/10.17747/2618-947X-019-1-58-69> (in Russian)
2. Shats M.M., Skachkov Yu.B., Cherepanova A.P. Street injuries in Yakutsk as a derivative of the state of road systems. *Yakutskiy meditsinskiy zhurnal*. 2017; 59(3): 113–6. (in Russian)
3. Devyatkov G.I., Mchedlishvili A.A., Shchepetkova E.R. The analysis of indicators of the traumatism bound to the controlled reason (ice) on an example of the large regional centre (Perm). *Mezhdunarodnyy zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy*. 2018; (11): 267–71. (in Russian)
4. Björnstig U., Björnstig J., Dahlgren A. Slipping on ice and snow – elderly people and young men are typical victims. *Accid. Anal. Prev.* 1997; 29(2): 211–5. [https://doi.org/10.1016/S0001-4575\(96\)00074-7](https://doi.org/10.1016/S0001-4575(96)00074-7)
5. Morency P., Voyer C., Burrows S., Goudreau S. Outdoor falls in an urban context: winter weather impacts and geographical variations. *Can. J. Public Health*. 2012; 103(3): 218–22. <https://doi.org/10.1007/bf03403816>
6. Murray I.R., Howie C.R., Biant L.C. Severe weather warnings predict fracture epidemics. *Injury*. 2011; 42(7): 687–90. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2010.12.012>
7. Merrild U., Bak S. An excess of pedestrian injuries in icy conditions: A high-risk fracture group – elderly women. *Accid. Anal. Prev.* 1983; 15(1): 41–8.
8. Safonova Yu.A., Zotkin E.G., Toroptsova N.V. Diagnosis for risk for falls and their prevention: draft clinical guidelines by the association of rheumatologists of Russia and the Russian osteoporosis association. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya*. 2020; 58(2): 133–9. <https://doi.org/10.14412/1995-4484-2020-133-139> (in Russian)
9. Nikitin A.A. Deicing materials. In search of a compromise. *Bashkirskiy ekologicheskiy vestnik*. 2013; (3–4): 33–5. (in Russian)
10. Arzhanukhina S.P., Garibov R.B., Kochetkov A.V., Yankovskiy L.V., Glukhov T.A., Bobkov A.V. The choice of requirements for deicing materials using in winter maintenance of metropolis highways. *Voda: khimiya i ekologiya*. 2013; 58(4): 106–15. (in Russian)
11. Andreychatenok V.V., Vandyshov S.A., Zotikov V.S., Primakov A.A., Rebristaya A.P., Rodin A.A. The composition of the anti-icing reagent. Patent RF № 2259383 C1; 2005. (in Russian)
12. Achkeeva M.V., Morozov I.V., Romanyuk N.V., Sharshkov V.V. The method for preventing or eliminating slippery of the road surface, the method for preparing liquid anti-icing reagent and production line for its preparation. Patent RF № 2352709 C2; 2009. (in Russian)
13. Buteau G.H., Cushman J.R., Griffis L.C., Rogers B.C., Duke J.T., Cooper P.N. The effects of exposure to Chevron Ice-B-Gon® deicer in laboratory animals and human volunteers. *Resour. Conserv. Recycl.* 1992; 7(1–3): 133–8. [https://doi.org/10.1016/0921-3449\(92\)90011-P](https://doi.org/10.1016/0921-3449(92)90011-P)
14. Rusakov N.V., Mukhambetova L.Kh., Kryatov I.A., Koganova Z.I., Fadeeva I.I., Chudakova S.B., et al. Evaluation of the hazard of soil-polluting chemicals upon exposure of experimental animals. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2007; 85(2): 68–70. (in Russian)
15. Chudakova S.B. *Toxicological and hygienic assessment of the hazard of anti-icing reagents*: Diss. Moscow; 2006. (in Russian)
16. Kryatov I.A., Tonkopyi N.I., Vodyanova M.A., Rusakov N.V., Doneryan L.G., Evseeva I.S., et al. Methodical approaches to the substantiation of hygienic requirements for the application of deicing materials. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2014; 93(6): 52–4. (in Russian)
17. Alikbaeva L.A., Mokrousova O.N., Merkur'eva M.A., Bek A.V., Sadchenko V.Yu. Toxicological-hygienic characteristics of chlorine-containing deicing materials. *Profilakticheskaya meditsina*. 2014; (4): 25–9. (in Russian)
18. Alikbaeva L.A., Zolotareva A.A., Bek A.V., Ryzhkov A.L. Toxicological-hygienic assessment of solid chemical de-icing materials. *Profilakticheskaya i klinicheskaya meditsina*. 2019; (1): 22–7. (in Russian)
19. Vodyanova M.A., Kryatov I.A., Chudakova S.B., Ushakova O.V., Evseeva I.S., Makovetskaya A.K., et al. Evaluation of allergenic, immunogenic and skin-irritant effects of deicing chemicals in warm-blooded animals. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2019; 167(5): 656–9.
20. Stocks J., Dormandy T.L. A direct thiobarbituric acid-reacting chromogen in human red blood cells. *Clin. Chim. Acta*. 1969; 27(1): 117–20. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(70\)90383-9](https://doi.org/10.1016/0009-8981(70)90383-9)
21. Ellman G.L. Tissue sulphydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 1959; 82(1): 70–77.
22. Sun N., Zigmund S. An improved spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on epinephrine autoxidation. *Anal. Biochem.* 1978; 90(1): 81–9. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(78\)90010-6](https://doi.org/10.1016/0003-2697(78)90010-6)
23. Korolyuk M.A., Ivanova L.I., Mayorova I.G., Tokarev V.E. Method for the determination of catalase activity. *Laboratornoye delo*. 1988; (4): 44–7. (in Russian)
24. Arutyunyan A.V., Dubinina E.E., Zybinina N.N. *Methods for Assessing of Free Radical Oxidation and Antioxidant System of the Organism [Metody otsenki svobodnorodikal'nogo oksileniya i antioksidantnoy sistemy organizma]*. St. Petersburg: Foliant; 2000. (in Russian)

25. Sidorenko G.I., Merkur'eva R.V., eds. Guidelines for the evaluation of biochemical, morphological, immunological and physiological indicators of early changes in human functional reactions under exposition to environmental factors. Moscow-Perm'; 1986: 32–3. (in Russian)
26. Boyaka P.N., McGhee J.R., Czerkinsky C., Mestecky J. Mucosal vaccines: an overview. In: Mestecky J., Lamm M.E., eds. *Mucosal Immunology*. Cambridge: Academic Press, 2005: 855–74.
27. Sinyashina L.N., Semin E.G., Medkova A.Yu., Syundyukova R.A., Karataev G.I. Pre-clinical toxicity study and safety assessment of candidate live pertussis vaccine for intranasal administration. *Epidemiologiya i vaksino-profilaktika*. 2018; 17(6): 98–108. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2018-17-6-98-108> (in Russian)
28. Wang-Fischer Y. *Manual of Stroke Models in Rats*. Boca Raton: CRC Press; 2008.
29. Song G., Xi G., Li Y., Zhao Y., Qi C., Song L., et al. Double triggers, nasal induction of a Parkinson's disease mouse model. *Neurosci. Lett.* 2020; 724: 134869. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2020.134869>
30. Wang C.Y., Ihmsen H., Hu Z.Y., Chen J., Ye X.F., Chen F., et al. Pharmacokinetics of intranasally administered dexmedetomidine in Chinese children. *Front. Pharmacol.* 2019; 10: 756. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00756>
31. Hanson L.R., Roeytenberg A., Martinez P.M., Coppes V.G., Sweet D.C., Rao R.J., et al. Intranasal deferoxamine provides increased brain exposure and significant protection in rat ischemic stroke. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2009; 330(3): 679–86. <https://doi.org/10.1124/jpet.108.149807>
32. Thorne R.G., Pronk G.J., Padmanabhan V., Frey W.H. Delivery of insulin-like growth factor-I to the rat brain and spinal cord along olfactory and trigeminal pathways following intranasal administration. *Neuroscience*. 2004; 127(2): 481–96. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.05.029>
33. Pires A., Fortuna A., Alves G., Falcao A. Intranasal drug delivery: how, why and what for? *J. Pharm. Pharm. Sci.* 2009; 12(3): 288–311. <https://doi.org/10.18433/j3nc79>
34. Hazardous Substances Data Bank (HSDB). Record Name: SODIUM CHLORIDE, CID 5234. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/source/hsdb/6368>
35. Kagen M.H., Bansal M.G., Grossman M. Calcinosis cutis following the administration of intravenous calcium therapy. *Cutis*. 2000; 65(4): 193–4.
36. Moss J., Syrengelas A., Antaya R., Lazova R. Calcinosis cutis: a complication of intravenous administration of calcium gluconate. *J. Cutan. Pathol.* 2006; 33(Suppl. 2): 60–2. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0560.2006.00519.x>
37. Lin C., Hsieh K.C., Yeh M.C., Sheen-Chen S.M., Chou F.F. Skin necrosis after intravenous calcium chloride administration as a complication of parathyroidectomy for secondary hyperparathyroidism: report of four cases. *Surg. Today*. 2007; 37(9): 778–81. <https://doi.org/10.1007/s00595-006-3426-z>
38. Jiang M., Terra J., Rossi A.M., Morales M.A., Saitovitch E.B., Ellis D.E. Fe²⁺/Fe³⁺ substitution in hydroxyapatite: Theory and experiment. *Phys. Rev. B*. 2002; 66(22): 224107.
39. Kolmas J., Groszyk E., Kwiatkowska-Różycka D. Substituted hydroxyapatites with antibacterial properties. *BioMed Res. Int.* 2014; 2014: 178123. <https://doi.org/10.1155/2014/178123>
40. Han S.X., Ning Z.W., Chen K., Zheng J. Preparation and tribological properties of Fe-hydroxyapatite bioceramics. *Biosurf. Biotribol.* 2017; 3(2): 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.bsbt.2017.07.001>
41. Patel G.B., Zhou H., Ponce A., Chen W. Safety evaluation of calcium administered intranasally to mice. *Int. J. Toxicol.* 2009; 28(6): 510–8. <https://doi.org/10.1177/1091581809347388>
42. Southam D., Dolovich M., O'Byrne P.M., Inman M. Distribution of intranasal instillations in mice: effects of volume, time, body position, and anesthesia. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2002; 282(4): L833–9. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00173.2001>
43. Rozov S.Yu., Patkina I.A., Rozov Yu.N., Shestachenko A.Yu. Application of formic acid salts to improve the properties of de-icing materials. *Eur. J. Analyt. Appl. Chem.* 2017; (1): 21–30. <https://doi.org/10.20534/EJAAC-17-1-21-30> (in Russian)
44. Cook R.J., Champion K.M., Giometti C.S. Methanol toxicity and formate oxidation in NEUT2 mice. *Arch. Biochem. Biophys.* 2001; 393(2): 192–8. <https://doi.org/10.1006/abbi.2001.2485>
45. Hanzlik R.P., Fowler S.C., Eells J.T. Absorption and elimination of formate following oral administration of calcium formate in female human subjects. *Drug Metab. Dispos.* 2005; 33(2): 282–6. <https://doi.org/10.1124/dmd.104.001289>
46. Brosnan M.E., Brosnan J.T. Formate: the neglected member of one-carbon metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* 2016; 36: 369–88. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-071715-050738>