

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616-092.9:613.2.099: 615.1918+919]

Багрянцева О.В.^{1,2}, Гмошинский И.В.¹, Евстратова А.Д.¹, Трушина Э.Н.¹, Мустафина О.К.¹, Сото Х.С.¹, Ригер Н.А.¹, Шумакова А.А.¹, Хотимченко С.А.^{1,2}**ХАРАКТЕРИСТИКА БИОМАРКЕРОВ ТОКСИЧНОСТИ ОКАДАИКОВОЙ КИСЛОТЫ IN VIVO**¹ФГБУН «Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи», 109240, Москва;²Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, 119991, Москва

Введение. Окадаиковая кислота (ОК) относится к числу токсинов морепродуктов, вызывающих диарею. В настоящее время установлены показатели токсичности ОК, определены основные молекулы-мишени её действия, её роль в качестве промотора опухолевых процессов и апоптоза. Однако в доступной литературе практически отсутствуют данные о токсикокинетике ОК и молекулярных биомаркерах её действия для теплокровных животных. Целью настоящей работы явилось определение биомаркеров токсичности ОК в экспериментах *in vivo* и *ex vivo*.

Материал и методы. Эксперимент проведен на 74 крысах самцах линии Wistar исходной массой тела 100 ± 10 г. В работе использовали препарат ОК производства фирмы «FermentecLtd.» (Израиль) в виде метанольного раствора. Перед проведением исследований концы удаляли из препарата. Для получения рабочих разведений токсина аликваты спиртового раствора ОК концентрацией 10 мг/мл разбавляли стерильным раствором 0,15 М NaCl с получением растворов концентрацией ОК 50, 100 и 150 мкг/мл. Указанные растворы вводили крысам указанных групп однократно в дозах 1 мл/кг массы тела внутривентриально. Животным контрольных групп вводили раствор NaCl. Выведение животных из эксперимента осуществляли через 6, 24 и 168 ч после введения препаратов ОК путём декапитации под эфирной анестезией. Определяли массу внутренних органов, биохимические и гематологические показатели крови, активность глутатионпероксидазы, небелковых тиолов в печени, уровни цитокинов IFN- γ , IL-10, IL-17A в плазме крови и в лизатах клеток печени, апоптоз клеток печени, уровень малонового диальдегида в печени.

Результаты. Проведённые исследования показали, что минимальные проявления токсического действия окадаиковой кислоты при её внутривентриальном введении (сдвиги в соотношении нейтрофилов и лимфоцитов, повышение активности АСТ, изменения активности глутатионпероксидазы) наблюдаются уже при дозе 50 мкг/кг м. т. С учётом коэффициента безопасности, равного трём, безопасный уровень острого воздействия ОК (ARfD) должен быть пересмотрен и составлять 0,27 мкг/кг м. т. Полученные данные свидетельствуют о необходимости проведения дополнительных оценок рисков этого токсина для здоровья потребителей и, возможно, пересмотра установленных значений безопасности содержания этого токсина в моллюсках. Впервые показана возможность использования в качестве маркеров токсического действия окадаиковой кислоты в эксперименте следующих показателей окислительного метаболизма: тиоловых соединений, активности глутатионпероксидазы, содержания малонового диальдегида в печени.

Ключевые слова: окадаиковая кислота; маркеры токсического действия; тиоловые соединения; глутатионпероксидаз; малоновый диальдегид.

Для цитирования: Багрянцева О.В., Гмошинский И.В., Евстратова А.Д., Трушина Э.Н., Мустафина О.К., Сото Х.С., Ригер Н.А., Шумакова А.А., Хотимченко С.А. Характеристика биомаркеров токсичности окадаиковой кислоты *in vivo*. Гигиена и санитария. 2018; 97(4): 355-361. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0016-9900-2018-97-4-355-361>

Для корреспонденции: Багрянцева Ольга Викторовна, доктор биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. пищевой токсикологии и оценки безопасности нанотехнологий ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии». E-mail: bagryantseva@ion.ru

Bagryantseva O.V.^{1,2}, Gmshinsky I.V.¹, Evstratova A.D.¹, Trushina E.N.¹, Mustafina O.K.¹, Soto Kh.S.¹, Riger N.A.¹, Shymakova A.A.¹, Khotimchenko S.A.^{1,2}

CHARACTERISTICS OF BIOMARKERS OF THE TOXICITY OF OKADAIC ACID IN VIVO¹Federal Research Centre of Nutrition, Biotechnology, and Food Safety, Moscow, 109240, Russian Federation;²I.M.Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, 119991, Russian Federation

Okadaic acid (OA) is relating to the number of seafood toxins causing diarrhea. At the present time, there was determined the toxicity index of OA; the main target molecules of its action, its role as a promoter of tumor processes and apoptosis have been investigated. However, in the available literature, data on the toxicokinetics of OA and molecular biomarkers of its action for warm-blooded animals are practically absent. The purpose of this work was to determine biomarkers of toxicity of OA in experiments *in vivo* and *ex vivo*. The experiment was performed on 74 male Wistar rats with an initial body weight of 100 ± 10 g. In the work, there was used a solution of OA in methanol, produced by "FermentecLtd." (Israel). Prior to the studies, methanol was removed from the preparation. To obtain working dilutions of the toxin, aliquots of the alcoholic OA solution with a concentration of 10 ppm were diluted with a sterile solution of 0.15M NaCl to obtain solutions with a concentration of OA of 50, 100 and 150 ppb. These solutions were administered to the rats in doses of 1 ml/kg of body weight intraperitoneally. The animals of the control groups were injected with NaCl solution. Excretion of animals from the experiment was carried out 6, 24 and 168 hours after the administration of OA preparations by decapitation under ether anesthesia. The mass of internal organs, biochemical and hematological blood indices, the activity of glutathione peroxidase, non-protein thiols in the liver, cytokine levels of IFN- γ , IL-10, IL-17A in blood plasma and liver cell lysates, liver cell apoptosis, malonic dialdehyde level in the liver were analyzed. Studies have shown minimal manifestations of toxic effects of OA in case of intraperitoneal administration (shifts in the ratio of neutrophils and lymphocytes, increased activity of AST,

changes in the activity of glutathione peroxidase) to be observed even at a dose of 50 µg/kg of body weight. Taking into account the safety factor of 3, the ARfD level of OA should be revised and accepted to be equal to 0.27 µg/kg of body weight. The data obtained indicate the need for additional risk assessments of this toxin for the health of consumers and, possibly, a revision of the established values of the safe content of this toxin in mollusks. For the first time, there was shown the possibility of using the following marker of toxic action of OA: non-protein thiols, the activity of glutathione peroxidase, and the content of malonic dialdehyde in the liver.

Key words: *okadaic acid; markers of toxic action; thiol compounds; glutathione peroxidase; malonic dialdehyde.*

For citation: Bagryantseva O.V., Gmshinsky I.V., Evstratova A.D., Trushina E.N., Mustafina O.K., Soto Kh.S., Riger N.A., Shymakova A.A., Khotimchenko S.A. Characteristics of biomarkers of the toxicity of okadaic acid *in vivo*. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)* 2018; 97(4): 355-361. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0016-9900-2018-97-4-355-361>

For correspondence: Olga V. Bagryantseva, doctor of biological sciences, leading researcher of the laboratory of food toxicology and safety assessment nanotechnology of the Federal Research Centre of Nutrition, Biotechnology and Food Safety, Moscow, 109240, Russian Federation. E-mail: bagryantseva@ion.ru

Information about authors:

Bagryantseva O.V., <https://orcid.org/0000-0003-3174-2675>; Gmshinsky I.V., <http://orcid.org/0000-0002-3671-6508>; Riger N.A., <https://orcid.org/0000-0001-7149-2485>; Khotimchenko S.A. <https://orcid.org/0000-0002-5340-9649>.

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

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

Received: 15 January 2018

Accepted: 24 April 2018

Введение

Окадаиковая кислота (ОК) относится к числу токсинов морепродуктов, вызывающих диарею [1]. Её первичными продуцентами являются бурые водоросли динофлагеллаты, относящиеся к родам *Dinophysis spp.* и *Prorocentrum spp.* Моллюски, креветки, крабы и некоторые виды рыб, питаясь этими водорослями, накапливают ОК в жировой ткани, становясь, таким образом, ядовитыми для людей, употребляющих эти гидробионты в пищу [2]. Вследствие высокой липофильности ОК относительно легко всасывается в желудочно-кишечном тракте, после чего сравнительно медленно метаболизируется и элиминируется из организма [1, 3, 4]. Механизм токсического действия ОК и её производных (DTX1, DTX2 и DTX3) предположительно связан с тем, что они, являясь мощными ингибиторами фосфатаз, вызывают нарушения внутриклеточной передачи сигнала с последующим развитием воспалительных процессов. Вследствие избыточного накопления фосфорилированных белков происходит экспрессия генов клеточной пролиферации, что может приводить к развитию канцерогенеза. В системах *in vitro* ОК индуцирует снижение продукции IL-1 в моноцитах при концентрациях от 0,1 до 1,0 мкг/мл [3, 5–9]. Имеются также данные, что ОК является причиной развития апоптоза [2, 3, 10].

По данным [1, 11, 12], среднетелальная доза (LD₅₀) ОК при внутрибрюшинном введении составляет от 192 до 225 мкг/кг массы тела (м. т.), доза минимального неблагоприятного воздействия (LOAEL) при пероральном введении – 75 мкг/кг м. т., безопасный уровень острого воздействия ОК (ARfD) – 0,33 мкг/кг м. т. (20 мкг/человека с м. т. 60 кг при коэффициенте безопасности равном 3). В соответствии с мнением Европейского Агентства по безопасности пищевых продуктов (EFSA), в порции моллюсков (400 г) содержание ОК не должно превышать 18 мкг (т. е. 45 мкг/кг мяса моллюсков) [4, 12].

Таким образом, в настоящее время установлены показатели токсичности ОК, определены основные молекулы-мишени её действия, её роль в качестве промотора опухолевых процессов и апоптоза. Однако в доступной литературе практически отсутствуют данные о токсикокинетике ОК и молекулярных биомаркерах её действия для теплокровных животных. Целью настоящей работы явилось определение биомаркеров токсичности ОК в экспериментах *in vivo* и *ex vivo*.

Материал и методы

Эксперимент проведён на 74 крысах самцах линии Wistar исходной массой тела 100 ± 10 г, полученных 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 освещённости и температуре 21 ± 1 °С. Все крысы были разделены методом случайной выборки на 12 групп численностью по 6 (группы 1, 3–12) или 8 особей (группа 2); исходная м. т. в группах не различалась ($p > 0,1$ ANOVA). Работу с животным проводили в соответствии с российскими требованиями к надлежащей лабораторной практике [13].

В работе использовали препарат ОК производства фирмы «FermentecLtd.» (Израиль) в виде метанольного раствора. Чистота препарата по данным ВЭЖХ-МС составила не менее 98,03%. Непосредственно перед проведением исследований метанол удаляли из препарата методом вакуумного выпаривания при температуре не выше +20 °С в течение не более 4 ч и сухой остаток перерастворяли в 96%-ном растворе этилового спирта по ГОСТ 5962 – 2013. Для получения рабочих разведений токсина аликвоты спиртового раствора ОК концентрацией 10 мг/мл разбавляли стерильным апиrogenным раствором 0,15 М NaCl с получением растворов концентрацией 50 (группы 2, 6, 10), 100 (группы 3, 7, 11) и 150 (группы 4, 8, 12) мкг/мл. Указанные растворы вводили крысам указанных групп однократно в дозы 1 мл/кг м. т. внутрибрюшинно. Животным контрольных групп 1, 5, 9 вводили в том же количестве раствор NaCl.

Выведение животных из эксперимента осуществляли через 6 ч (группы 1–4), 24 (группы 5–8) и 168 (группы 9–12) после введения препаратов ОК путём декапитации под эфирной анестезией. Собирали кровь сантикоагулянтном (трикалийевая соль ЭДТА), отбирали образцы ткани печени для культивации *ex vivo*, для определения апоптоза и содержания восстановленных тиолов. Массу внутренних органов (печень, почки, селезёнка, лёгкие, сердце, тимус, надпочечники, гонады) определяли на электронных весах с погрешностью ± 0,01 г.

Биохимические показатели сыворотки определяли на биохимическом анализаторе «Konelab 20i» (Финляндия); активность глутатионпероксидазы определяли спектро-

Относительная масса органов крыс через 6 и 168 ч после введения окардиновой кислоты

Группа***	Число крыс	Доза ОК, мкг/кг	Время выведения из эксперимента через, ч	Органы**, относительная масса, % от массы тела, $M \pm m$					
				печень	селезёнка	сердце	почки	тимус	лёгкие
1	6	контроль	6	4,29±0,12	0,46±0,05	0,47±0,02	0,92±0,04	0,33±0,02	0,74±0,04
2	8	50		4,45±0,23	0,55±0,08	0,44±0,02	0,97±0,03	0,27±0,02	0,76±0,03
3	6	100		4,91±0,16*	0,61±0,04*	0,47±0,02	0,96±0,02	0,32±0,03	0,87±0,04*
4	6	150		4,13±0,20	0,49±0,07	0,40±0,02*	0,84±0,04	0,29±0,02	0,77±0,05
9	6	контроль	168	5,28±0,18	0,81±0,09	0,45±0,04	0,80±0,02	0,29±0,04	0,73±0,03
10	6	50		4,86±0,40	0,82±0,14	0,43±0,04	0,76±0,06	0,28±0,04	0,71±0,08
11	6	100		5,45±0,26	0,95±0,13	0,45±0,03	0,88±0,02*	0,36±0,03*	0,80±0,03
12	6	150		5,16±0,41	0,88±0,07	0,41±0,03	0,80±0,09	0,32±0,03	0,77±0,06

Примечание. Здесь и в табл. 2–4: * – различие с группой контроля для данного времени достоверно, $p < 0,05$, t -тест Стьюдента и/или критерий Манна–Уитни; ** – для массы гонад и надпочечников достоверных различий не выявлено (данные не показаны); *** – при сроке 24 часа после введения достоверных различий не выявлено (данные не показаны).

фотометрическим методом, согласно [14], с незначительными модификациями; содержание небелковых тиолов в печени – спектрофотометрическим методом с реактивом Элмана. Уровни цитокинов IFN- γ , IL-10, IL-17A в плазме крови и в лизатах клеток печени определяли коммерческим набором для мультиплексного иммуноанализа «Procarta Plex Rat Basic Kit», дополняемый реагентами «Procarta Plex Rat» IL-17A (CTLA-8) производства фирмы «Termo Fisher Scientific» (Австрия). Исследования проводили на мультиплексном анализаторе Luminex 200 (Luminex Corporation, США) по технологии xMAP с использованием программного обеспечения Luminex xPONENT Version 3.1. Уровень содержания малонового диальдегида в печени определяли методом [15].

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 печени изучали на проточном цитофлуориметре «FC 500» («Beckman Coulter International S.A.», Австрия) с использованием технологии окрашивания гепатоцитов в суспензии флуоресцентными реагентами FITC-аннексином V и 7-аминоактиномицином (7-AAD) [16].

Статистическую обработку результатов проводили путём 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

В результате введения ОК в указанной дозе крысам летальности и выраженных признаков заболеваемости животных выявлено не было во всех опытных группах. Через 168 ч после введения токсина крысы групп 11 и 12 отставали от животных контрольной группы 9 в прибавке массы тела, которая составляла при выведении из эксперимента $133,4 \pm 3,6$ (контроль), $114,3 \pm 2,3$ г (группа 11, $p_{9,11} < 0,05$) и $122,7 \pm 8,1$ г (группа 12). Как следует из результатов определения относительных масс органов (табл. 1), через 6 часов после введения ОК, что соответствует острому периоду интоксикации, наблюдается достоверное ($p < 0,05$) увеличение массы печени, селезёнки и лёгких в группе 3 (доза 100 мкг/кг м. т.) и снижение

массы сердца в группе 4 (150 мкг/кг м. т.). Через 168 ч после введения токсина отмечается достоверное снижение массы почек и повышение массы тимуса в группе 11 (100 мкг/кг м. т.). В период 24 ч после введения достоверных различий в массах внутренних органов не выявлено (данные не показаны).

Определение показателей эритроцитов и лейкоцитов крови животных (табл. 2) не выявило значительных сдвигов под воздействием применявшихся доз ОК, за исключением 2-кратного уменьшения количества моноцитов в группе 10. Помимо этого отмечались небольшие по абсолютной величине, но достоверные ($p < 0,05$) сдвиги в ряде показателей эритроцитов и тромбоцитов в группе 2 (нейтрофилы, лимфоциты), в группе 10 (моноциты), в группе 7 (содержание и концентрация гемоглобина в эритроците). Указанные изменения не демонстрировали чёткой зависимости от дозы токсина.

Достоверных изменений биохимических показателей (табл. 3) в плазме крови крыс, получавших ОК, через 6 ч (группы 1–4) не было установлено (данные не показаны). Однако в дальнейшем был выявлен ряд разнонаправленных изменений в зависимости от дозы ОК и времени после её введения. Так, через 24 ч при дозе 100 мкг/кг м. т. отмечены изменения уровней ЛПНП, ЛПВП и триглицеридов, а при 150 мкг/кг м. т. – только ЛПВП. Одновременно у животных, получавших ОК в дозе 100 мкг/кг м. т., наблюдалось увеличение содержания креатинина и мочевой кислоты. После 168 ч направленность изменений отличалась от 24 ч: уровни креатинина и мочевой кислоты были незначительно, но достоверно снижены при дозе 100 мкг/кг м. т., а при наибольшей из доз (150 мкг/кг м. т.) снижался уровень мочевины, что может указывать на торможение процессов орнитинового цикла в печени. Для этой же дозы было характерно достоверное снижение содержания общего белка плазмы крови. Достоверных изменений активности печёночных трансаминаз в плазме крови у животных опытных групп не наблюдалось, за исключением возрастания АСТ в группе 6 (доза ОК 50 мкг/кг м. т., через 24 ч).

Как следует из данных рис. 1, а, достоверных изменений в уровне малонового диальдегида (МДА) в ткани печени через 6 и 24 ч после введения ОК не наблюдалось ни при одной из доз. После 168 ч содержание МДА достоверно снижалось при двух наибольших дозах токсина. В это время уровень МДА достоверно коррелировал с активностью глутатионпероксидазы эритроцитов (рис. 1, в),

Гематологические показатели (эритроциты, лейкоциты), $M \pm m$ крыс через 6, 24 и 168 ч после введения ОК (в группах по 6 животных)

Группа	Доза ОК, мг/кг	Время выведения из эксперимента, ч	Среднее содержание Нв в эритроците, пг	Средняя концентрация Нв в эритроците г/л	Лейкоциты, 10^9 л ⁻¹	Нейтрофилы, %	Лимфоциты, %	Моноциты, %
1	контроль	6	19,9 ± 0,3	322 ± 3	7,47 ± 0,84	16,7 ± 1,3	64,7 ± 2,3	17,0 ± 1,9
2	50		19,6 ± 0,3	325 ± 2	6,00 ± 0,90	16,3 ± 1,2	67,2 ± 1,5	15,0 ± 1,3
3	100		19,6 ± 0,2	320 ± 2	5,73 ± 1,11	21,0 ± 1,9	60,0 ± 2,3	17,4 ± 3,7
4	150		19,4 ± 0,4	318 ± 3	6,58 ± 0,86	19,6 ± 2,9	62,2 ± 2,0	17,0 ± 1,5
5	контроль	24	18,9 ± 0,2	314 ± 3	11,4 ± 2,0	16,0 ± 1,2	63,4 ± 1,8	18,7 ± 2,1
6	50		19,3 ± 0,8	316 ± 3	10,0 ± 0,7	29,3 ± 4,5*	51,4 ± 3,1*	17,7 ± 2,6
7	100		20,1 ± 0,2*	325 ± 2*	10,6 ± 1,2	21,7 ± 3,0	64,0 ± 1,8	13,2 ± 1,7
8	150		18,9 ± 0,4	316 ± 3	12,6 ± 3,1	16,1 ± 2,5	67,4 ± 5,0	13,9 ± 2,8
9	контроль	168	19,7 ± 0,3	317 ± 1	6,06 ± 1,13	17,1 ± 2,6	61,5 ± 1,4	20,0 ± 1,6
10	50		19,2 ± 0,3	311 ± 5	11,8 ± 2,7*	25,1 ± 3,7	63,3 ± 3,6	10,4 ± 1,0*
11	100		18,4 ± 0,5	315 ± 2	9,50 ± 2,72	16,0 ± 3,0	61,0 ± 5,2	21,7 ± 3,5
12	150		18,9 ± 0,3	315 ± 1	9,18 ± 1,74	16,6 ± 1,0	60,9 ± 3,5	23,2 ± 3,5

а сами значения этой активности менялись в зависимости от дозы ОК немонотонно (рис 1, б). Через 6 ч активность глутатионпероксидазы была достоверно снижена во всех опытных группах, а при достижении 24 ч снижение её активности было статистически недостоверным.

В период 6 ч после введения ОК изменений в показателях апоптоза гепатоцитов (рис. 2, а-д) у крыс опытных групп не наблюдалось. Через 24 ч после введения максимальной дозы ОК (150 мг/кг м.т.) отмечено достоверное ($p_{5-8} < 0,05$) возрастание числа клеток на ранней стадии апоптоза; количество клеток в поздней стадии апоптоза при этом не увеличивалось, а при дозе 100 мг/кг м.т. даже снижалось на 0,15% ($p_{5-7} < 0,05$). Через 168 ч после введения токсина наибольшее возрастание числа клеток в ранней стадии апоптоза, общего количества клеток в апоптозе и снижение числа живых клеток отмечено при дозе 100 мг/кг м. т., а при дальнейшем увеличении дозы, по крайней мере, не возрастало. Тенденция к увеличению

числа мёртвых клеток при дозах 100 и 150 мг/кг м. т. была статистически незначимой.

Содержание небелковых тиолов в печени крыс (рис. 2, е), которые в норме представлены преимущественно SH-группами восстановленного глутатиона, достоверно снижалось с дозой ОК через 6 ч после её введения; через 24 ч достоверных изменений этого показателя не выявлено. Через 168 ч с начала эксперимента содержание тиолов в печени крыс контрольной группы 9 возрастало в 1,6 раза в сравнении с началом опыта (группы 1 и 5), что очевидным образом связано с ростом животных этих групп и увеличением общей клеточной массы печени. Однако при введении ОК содержание тиолов в печени снижалось дозозависимым образом, причем при дозе 150 мг/кг м. т. оно практически возвращалось к уровню, характерному для 24 ч.

Как следует из данных табл. 4, достоверных изменений в уровнях цитокинов IL-10, IL-17A и INF-g в плазме

Биохимические показатели плазмы крови крыс, $M \pm m$, через 6, 24 и 168 ч после введения окардиновой кислоты. В группах по 6 животных (группы 1, 3–12); 8 животных (группа 2)

Группа	Доза ОК, мг/кг	Время выведения из эксперимента через, ч	Холестерин ЛПВП, моль/л	Холестерин ЛПНП, моль/л	Триглицериды, ммоль/л	АЛТ, ед/мл	АСТ, ед/мл	Белок общий, г/л	Креатинин мкмоль/л	Мочевина ммоль/л	Мочевая кислота, мкмоль/л
1	контроль	6	0,75±0,02	1,21±0,06	0,82±0,06	76,8±6,7	174±6	44,6±1,1	48,3±1,0	5,91±0,27	89±8
2	50		0,72±0,02	1,08±0,09	0,78±0,07	71,5±2,2	185±14	45,2±1,7	48,5±0,7	6,69±0,36	85±7
3	100		0,83±0,04	1,27±0,08	0,78±0,09	84,1±4,2	162±15	42,6±1,4	52,8±1,7	6,61±0,39	110±27
4	150		0,78±0,04	1,24±0,14	0,77±0,05	91,8±7,4	187±13	46,3±1,7	51,1±1,1	5,94±0,37	113±24
5	контроль	24	0,77±0,06	0,86±0,10	1,36±0,21	98,2±3,5	212±11	49,6±1,0	53,4±1,4	6,86±0,44	120±15
6	50		0,79±0,04	1,00±0,06	0,85±0,07	107±10	280±28*	47,1±0,7	54,0±1,3	6,35±0,39	162±28
7	100		0,97±0,06*	1,34±0,13*	0,70±0,09*	104±16	257±50	54,2±2,1	58,9±1,5*	6,69±0,44	164 ± 20*
8	150		0,92±0,02*	0,97±0,10	1,13±0,16	96,5±9,2	227±25	51,6±1,0	58,1±2,0	6,67±0,50	127±31
9	контроль	168	0,98±0,07	0,96±0,13	1,17±0,24	100±3	206±28	56,5±2,0	64,7±0,8	7,63±0,29	175±18
10	50		0,95±0,04	0,82±0,08	0,86±0,07	87,6±2,9*	179±20	51,5±0,8*	59,8±1,3	6,73±0,60	99±12*
11	100		0,93±0,06	1,05±0,08	0,86±0,11	112±9	292±45	55,1±1,0	69,7±6,1	6,71±0,73	182±27
12	150		0,75±0,05	0,88±0,09	0,93±0,15	95,4±5,8	235±18	51,0±0,7*	61,0±2,8	5,16±0,41*	151±14

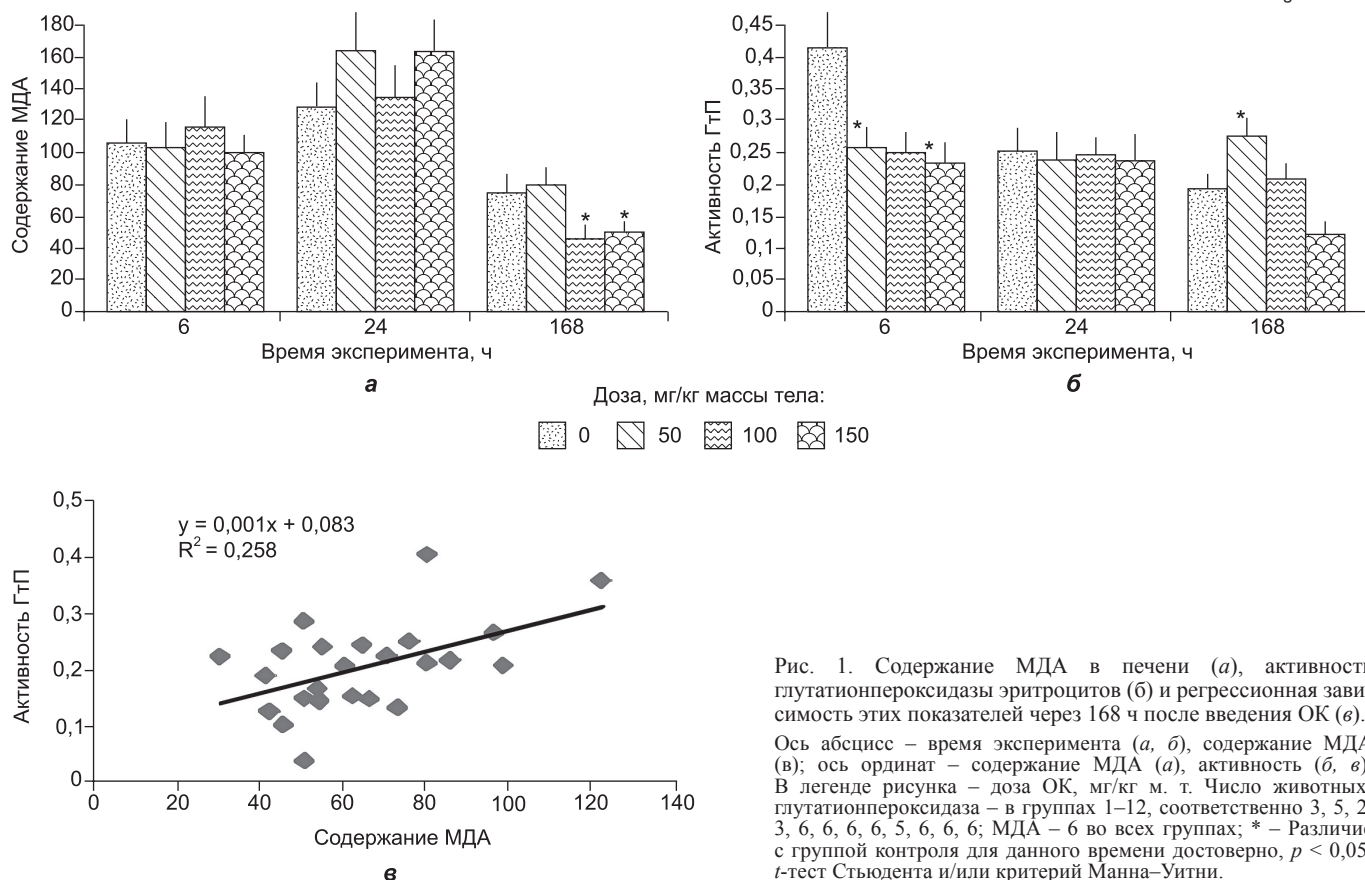


Рис. 1. Содержание МДА в печени (а), активность глутатионпероксидазы эритроцитов (б) и регрессионная зависимость этих показателей через 168 ч после введения ОК (в). Ось абсцисс – время эксперимента (а, б), содержание МДА (в); ось ординат – содержание МДА (а), активность (б, в). В легенде рисунка – доза ОК, мг/кг м. т. Число животных: глутатионпероксидаза – в группах 1–12, соответственно 3, 5, 2, 3, 6, 6, 6, 6, 5, 6, 6, 6; МДА – 6 во всех группах; * – Различие с группой контроля для данного времени достоверно, $p < 0,05$, *t*-тест Стьюдента и/или критерий Манна–Уитни.

крови крыс, получавших инъекции ОК, выявлено не было. Однако, в условиях культивации *ex vivo* клеток печени, полученных от этих животных, через 24 ч после введения токсина наблюдалось достоверное дозозависимое возрастание продукции INF-g (максимум в 1,6 раза при дозе 150 мг/кг м. т.) и IL-10 (максимум в 2,7 раза при той же дозе). Через 168 ч после начала эксперимента продукция цитокинов в опытных группах значимо не отличалась от контрольного уровня.

Обсуждение

Анализ характера действия ОК в нелетальных дозах на организм животных указывает на нарастание числа ответивших маркеров токсичности между 6 и 24 ч после введения токсина. Так, общее число достоверно изменившихся показателей на уровне значимости $p < 0,05$ составило 5 через 6 ч после введения токсина, через 24 ч увеличилось до 15 и через 168 ч осталось на том же уровне (15). При дозе 50 мг/кг м. т. число ответивших показателей (при всех трёх временах эксперимента) составило 10, при 100 мг/кг м. т. возросло до 20, а при 150 мг/кг м. т. снизилось до 5. Таким образом, минимальные проявления токсического действия ОК при её внутрибрюшинном введении (сдвиги в соотношении нейтрофилов и лимфоцитов, повышение активности АСТ, изменения активности глутатионпероксидазы) наблюдаются уже при дозе 50 мг/кг м. т., что соответствует данным литературы [1, 17]. При этом последовательность и набор наступающих изменений оказываются различными в трёх изученных фазах процесса интоксикации. Через 6 ч наблюдаются такие признаки, как изменение массы ряда внутренних органов (по-видимому, за счёт развития циркуляторных расстройств и отёка) [18]. Через 24 ч начинают преобладать эффекты со стороны иммунной

системы и системы кроветворения, что находит отражение в сдвигах гематологических показателей и продукции цитокинов IL-10 и INF-g (это указывает на адекватную активацию звена клеточного иммунитета, отвечающего за элиминацию повреждённых токсином клеток) [19], а также начинают усиливаться процессы апоптоза в печени и развиваются изменения со стороны липидного обмена. Через 168 ч преобладающими становятся процессы апоптоза, нарушение гомеостаза тиоловых соединений и угнетение показателей азотистого обмена.

Отсутствие прямой зависимости между дозой ОК и её влиянием на большинство изученных показателей может быть связано с двухфазным характером влияния этого вещества на фосфорилирование внутриклеточных мессенджеров, когда при низкой дозе токсина преобладает влияние на процессы клеточной пролиферации, а при высокой дозе – на усиление апоптоза [20]. Кроме того, фосфорилирование специфических серильных, треонильных или тирозильных остатков и последующее дефосфорилирование белковыми фосфатазами регулирует активность многих ферментов человека [21]. Фосфатазы воздействуют на гормональную (кальций-кальмодулиновую систему) и синтез вторичных мессенджеров. Эти эффекты обуславливают каскадный механизм действия ОК на клеточном уровне и в целом на организм [22]. Например, ОК ингибирует синтез инсулина [23], снижает образование индуцированных тромбином инозитолфосфатов (примерно на 55%) и увеличивает ингибирующее действие простаглицлина [24]. Такое обстоятельство в значительной степени затрудняет поиск мессенджеров токсического воздействия ОК на организм человека.

Изученный в данном исследовании набор показателей не даёт оснований утверждать, что механизм токсического

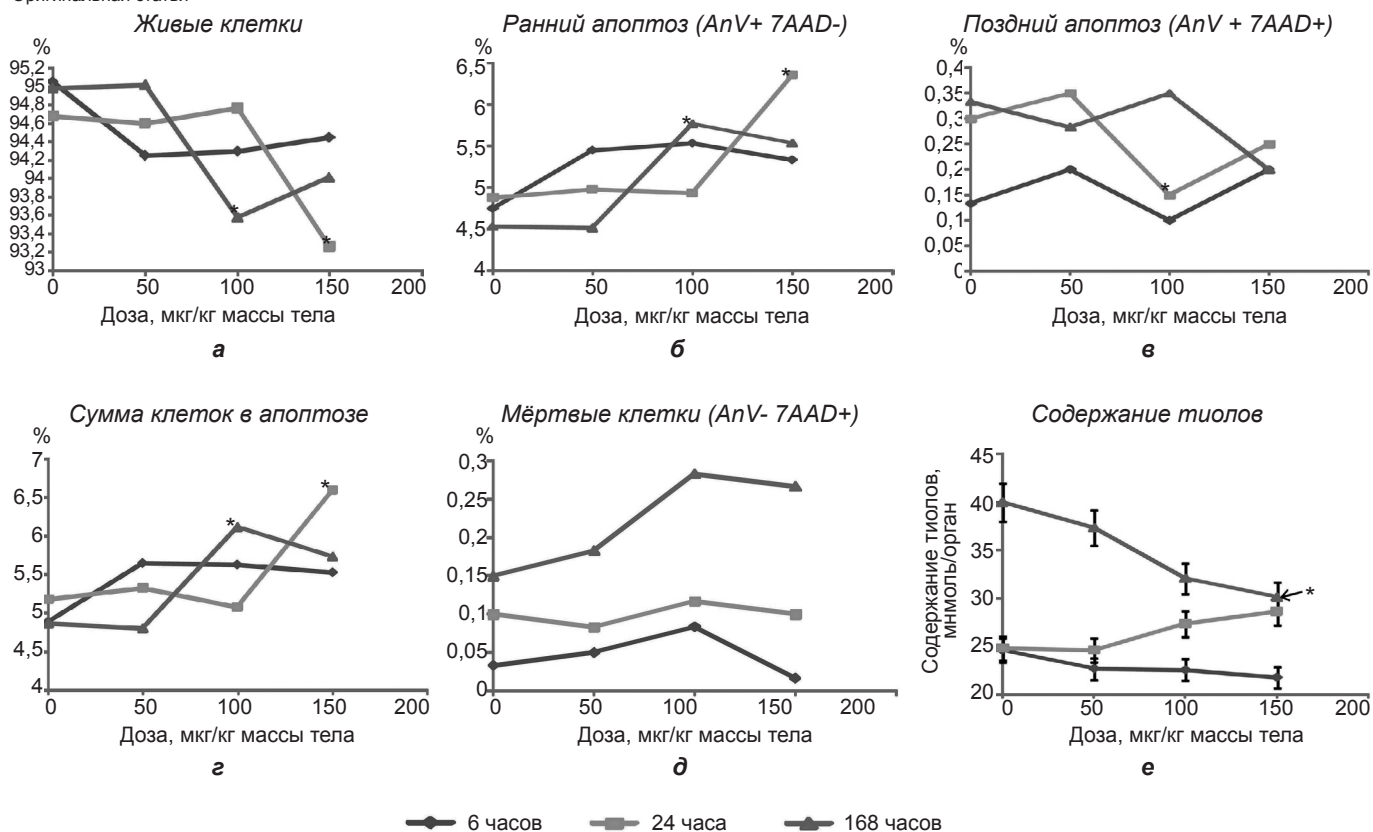


Рис. 2. Показатели апоптоза гепатоцитов (a–d) и общее содержание небелковых восстановленных тиолов (e) печени крыс в зависимости от дозы ОК через 6 ч (ромб), 24 ч (квадрат), 168 ч (треугольник) после её внутрибрюшинного введения.

Ось абсцисс: доза ОК, мкг/кг м. т. Ось ординат: a – живые клетки, AnV(-)7AAD(-), %; б – «ранний» апоптоз AnV(+)7AAD(-), %. Число животных по 6 в группе*. Различие с группой контроля для данного времени достоверно, $p < 0,05$, t -тест Стьюдента и/или критерий Манна–Уитни.

Таблица 4

Содержание в плазме крови и продукция клетками печени в первичной культуре цитокинов через 24 и 168 ч после введения крысам омега-3 полиненасыщенных жирных кислот. Медиана (интервал изменения), число животных (n) в группе

Группа	Доза ОК, мкг/кг	Время выведения из эксперимента через, ч	Содержание в плазме крови, пг/мл			Продукция клетками печени в первичной культуре, пг/мл культуральной среды		
			IFN- γ	IL-10	IL-17A	IFN- γ	IL-10	IL-17A
5	контроль	24	11,7 (7,5 – 19,6) n = 6	39,2 (27 – 129) n = 6	0,00620 (0,0033 – 0,015) n = 6	15,0 (11,1 – 18,4) n = 6	44,9 (29,2 – 62,9) n = 6	8,64 (5,9 – 16) n = 6
6	50		29,4 (8,7 – 93) n = 5	55,9 (1,7 – 143) n = 5	0,011 (0,0072 – 0,059) n = 5	15,3 (11,1 – 19,0) n = 6	39,2 (33,3 – 55,9) n = 6	9,61 (3,6 – 13,8) n = 6
7	100		20,8 (9,3 – 22) n = 3	48,6 (37 – 75) n = 3	0,0062 (0,0052 – 0,0072) n = 3	17,1 (14,7 – 29,4) n = 5	104,9 (29,2 – 163) n = 6	7,28 (5,0 – 18,2) n = 6
8	150		17,1 (5,2 – 48) N=6	31,2 (4,0 – 111) n = 6	0,0072 (0,0033 – 0,015) n = 6	22,6* (17,1 – 35,7) n = 6	123,2* (92,6 – 135) n = 6	9,12 (7,1 – 15,7) n = 6
9	контроль	168	12,3 (9,9 – 47) n = 6	59,3 (16 – 144) n = 6	0,0084 (0,0033 – 0,011) n = 6	23,3 (18,4 – 34,4) n = 5	138,5 (86,2 – 180) n = 6	17,9 (10,8 – 22,9) n = 6
10	50		40,4 (6,9 – 134) n = 6	58,1 (1,7 – 102) n = 4	0,0087 (0,0033 – 0,011) n = 6	22,0 (17,7 – 35,7) n = 6	153,7 (95,8 – 224) n = 6	17,3 (6,5 – 28,1) n = 6
11	100		21,1 (8,1 – 61) n = 6	41,1 (11 – 70) n = 6	0,0072 (0,0042 – 0,026) n = 6	21,1 (18,4–25,7) n = 4	147,1 (102,0 – 196) n = 6	20,7 (13,5 – 30,9) n = 6
12	150		13,2 (4,0 – 32) n =	43,9 (1,7 – 76) n = 6	0,0067 (0,0052 – 0,0082) n = 6	20,8 (15,9 – 24,5) n = 5	165,4 (149,3 – 207) n = 6	18,2 (15,8 – 20,2) n = 6

го действия ОК может каким-либо образом быть связан с окислительным стрессом. Напротив, содержание одного из его основных маркеров – МДА – в печени под действием высоких доз ОК медленно (к 168 ч опыта) снижается. Снижение уровня МДА в этот период коррелирует с подавлением активности глутатионпероксидазы, что соответствует данным литературы [25–27]. Можно предположить, что эти изменения являются следствием вмешательства ОК в естественные процессы окислительного метаболизма жирных кислот, продуктами которого, наряду с маркерным соединением МДА, являются разнообразные простагландины и простаглицлины [28], обладающие важными регуляторными функциями. Воздействие ОК на эти процессы может опосредоваться по данным литературы блокированием под действием ОК дефосфорилирования ядерных транскрипционных факторов – митоген-активируемой протеинкиназы (МАРК) и белка р53 [5, 20, 29], приводящим к сдвигам в балансе активности циклооксигеназы и липооксигеназы [30]. Однако для подтверждения этой гипотезы необходимы дальнейшие исследования.

В числе основных биомаркеров токсического действия ОК выделяется уровень тиоловых соединений, характеризующийся дозозависимым снижением под действием вводимого токсина. Это указывает на способность ОК нарушать тиоловый гомеостаз организма и делает перспективным поиск новых антидотов ОК на основе доноров SH-групп, таких, например, как восстановленный глутатион, серосодержащие аминокислоты и богатые ими белки.

Заключение

Проведенные исследования показали, что минимальные проявления токсического действия ОК при её внутрибрюшинном введении (сдвиги в соотношении нейтрофилов и лимфоцитов, повышение активности АСТ, изменение активности глутатионпероксидазы) наблюдаются уже при дозе 50 мкг/кг м. т. С учётом коэффициента безопасности, равного трём, безопасный уровень острого воздействия ОК (ARfD) должен быть пересмотрен и составлять 0,27 мкг/кг м. т. Полученные данные свидетельствуют о необходимости проведения дополнительных оценок рисков этого токсина для здоровья потребителей и, возможно, пересмотра установленных значений безопасного содержания этого токсина в моллюсках.

Впервые показана возможность использования в качестве маркеров токсического действия окадаиковой кислоты в эксперименте следующих показателей окислительного метаболизма: тиоловых соединений, активности глутатионпероксидазы, содержания малонового диальдегида в печени.

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.

Литература

(пп. 1–12, 15, 17–24, 26, 27 см. References)

- Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации № 193н от 01.04.2016 г. «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики».
- Разыграев А.В. Метод определения глутатионпероксидазной активности с использованием пероксида водорода и 5,5'-дитиобис(2-нитробензойной кислоты). *Клинико-лабораторный консилиум*. 2004. 4: 19–22.
- Распопов Р.В., Трушина Э.Н., Гмошинский И.В., Хотимченко С.А. Биодоступность наночастиц оксида железа при использовании их в питании. Результаты экспериментов на крысах. *Вопросы питания*. 2011.80(3): 25–30.
- Аджиев Д.Д. Исследование продуктов перекисного окисления липидов, неферментативной и ферментативной антиоксидантной системы в возрастной динамике самцов кроликов. *Вестник ВОГиС*, 2010, 14(4).

- Казимирко В.К., Иваницкая Л.Н., Кутовой В.В., Дубкова А.Г., Силантьева Т.С. Перекисное окисление липидов: противоречия проблемы. *Український ревматологічний журнал*. 2014(3):13-17.

References

- Marine biotoxins. FAO food and nutrition paper 80, Food and Agriculture Organization of the United Nations.-Rome. 2004:53-97.
- Assessment and management of biotoxin risks in bivalve mollusks. FAO fisheries and aquaculture technical paper 551, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 2011:163-193.
- Alarcan J. et al. Mixtures of Lipophilic Phycotoxins: Exposure Data and Toxicological Assessment. *Mar Drugs*. 2018.16(2):.46; doi: 10.3390/md16020046.
- Watanabe R. et al. Quantitative Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy Based on PULCON Methodology: Application to Quantification of Invaluable Marine Toxin, Okadaic Acid. *Toxins*. 2016. V. 8: 294 - 9; doi:10.3390/toxins8100294.
- Opsah J.A. et al. Identification of Dynamic Changes in Proteins Associated with the Cellular Cytoskeleton after Exposure to Okadaic Acid. *Mar. Drugs*. 2013.11:1763-1782; doi:10.3390/md11061763.
- Franchini A., Malagoli D., Ottaviani E. Targets and Effects of Yessotoxin, Okadaic Acid and Palytoxin: A Differential Review. *Mar. Drugs*. 2010. 8:658-677; doi:10.3390/md8030658.
- Munday R. Is Protein Phosphatase Inhibition Responsible for the Toxic Effects of Okadaic Acid in Animals? *Tox*.
- Zhang H. et al. Histone Modification Is Involved in Okadaic Acid (OA) Induced DNA Damage Response and G2-M Transition Arrest in Maize. *PLoS ONE*.2016. 11(5): e0155852. doi:10.1371/journal.pone.0155852.
- Valdiglesias V. et al. Okadaic Acid: More than a Diarrheic Toxin. *Mar. Drugs* 2013. 11: 4328-4349; doi:10.3390/md11114328.
- Haneji T. et al. Okadaic acid activates the PKR pathway and induces apoptosis through PKR stimulation in MG63 osteoblast-like cells. *International Journal Of Oncology*. 2013.42.:1904-1910; doi: 10.3892/ijo.2013.1911.
- Technical paper on Toxicity Equivalency Factors for Marine Biotoxins Associated with Bivalve Molluscs. *FAO and WHO*, 2016. Rome.
- Marine biotoxins in shellfish – okadaic acid and analogues. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food chain. *The EFSA Journal* (2008) 589:1-62.
- Order of the Ministry of Health of the Russian Federation No. 193n of 01.04.2016 “On Approval of the Rules for Good Laboratory Practice”.
- Razygraev A.V. Method for determination of glutathione peroxidase activity using hydrogen peroxide and 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid). *Kliniko-laboratornyj konsilium*. 2004. 4: 19-22.
- Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem*. 1979. 95(2): 351-358.
- Raspopov RV, Trushina EN, Gmozhinsky IV, Khotimchenko SA Bioavailability of iron oxide nanoparticles when used in nutrition. Results of experiments in rats. *Voprosy pitaniya*. 2011.80(3): 25–30.
- Chen C.-Y. et al. Marine Natural Product Inhibitors of Neutrophil-Associated Inflammation. *Mar. Drugs*. 2016.14 (141); doi:10.3390/md14080141.
- Chu Ji et al. Decreased myosin phosphatase target subunit 1(MYPT1) phosphorylation via attenuated rho kinase and zipper-interacting kinase activities in edematous intestinal smooth muscle. *Neurogastroenterol Motil*. 2012. 24(3). 18 p.- 257–e109. doi:10.1111/j.1365-2982.2011.01855.x.
- Penberthy K. K. Ex vivo modulation of the Foxo1 phosphorylation state does not lead to dysfunction of T regulatory cells. *PLOS ONE*. 2017.12(3). doi:10.1371. journal.pone.0173386DOI:10.1371/journal.pone.0173386.
- Gehring M.M. Microcystin-LR and okadaic acid-induced cellular effects: A dualistic response. *FEBS Lett*. 2004, 557, 1–8.
- Rodwell V. At al. Harpers Illustrated Biochemistry 30th Edition, 2015. ISBN-13: 9780071825344.
- Krzywińska E. et al. Phosphatase ABI1 and okadaic acid-sensitive phosphoprotein phosphatases inhibit salt stress-activated SnRK2.4 kinase. *BMC Plant Biology*. 2016. 16:136, doi 10.1186/s12870-016-0817-1.
- Sato Y. et al. Okadaic acid-induced decrease in the magnitude and efficacy of the Ca²⁺ signal in pancreatic b cells and inhibition of insulin secretion. *British Journal of Pharmacology*.1998. 123: 97–105; doi: 10.1038/sj.bjp.0701578
- Walker T.R., Watson S.P. Okadaic acid inhibit stivation of phospholipase C in human platelets by mimicking the action of protein kinases A and C. *Br.L. Pharmacol*.1992.105:627-631; PMC1908475.
- Adzhiev D.D. Research of products of lipid peroxidation, non-enzymatic and enzymatic antioxidant system in the age dynamics of male rabbits. *Vestnik VOGiS*, 2010, 14 (4).
- Yi K. D., Covey D.F., Simpkins J.W. Mechanism of Okadaic Acid Induced Neuronal Death and the Effect of Estrogens. *J Neurochem*. 2009 108(3):732–740. doi:10.1111/j.1471-4159.2008.05805.x.
- Huang C.-xin, Lv B., Wang Y. Protein Phosphatase 2A Mediates Oxidative Stress Induced Apoptosis in Osteoblasts. *Mediators of Inflammation*. 2015, Article ID 804260, 8 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2015/804260>.
- Kazimirko V.K., Ivanitskaya L.N., Kutova V.V., Dubkova AG, Silant'eva T.S. Peroxide oxidation of lipids: contradictions of the problem. *Український ревматологічний журнал*. 2014 (3): 13-17.
- Nunes M. J. Okadaic acid inhibits the trichostatin A-mediated increase of human CYP46A1 neuronal expression in an ERK1/2-Sp3-dependent pathway. *Journal of Lipid Research*. 2012. 53: 1910-1919; doi 10.1194/jlr.M027680.
- Kleppe R., Herfindal L., Doskeland S.O. Cell death inducing microbial protein phosphatase inhibitors—mechanisms of action. *Mar Drugs*. 2015.13(10): 6505–6520; doi: 10.3390/md13106505.