

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Уколов А.И., Лаптев Д.С., Карманов Е.Ю., Каракашев Г.В., Криворотов Д.В., Богаченков А.С.,
Нечайкина О.В., Бобков Д.В., Петунов С.Г.

Новые биомаркеры несимметричного диметилгидразина

ФГУП «Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека» Федерального медико-биологического агентства, 188663, г.п. Кузьмоловский, Ленинградская область, Российская Федерация

Введение. Несмотря на масштабное использование несимметричного диметилгидразина (далее – НДМГ) в отечественной ракетно-космической отрасли, до сих пор не были описаны его биомаркеры экспозиции в плазме крови и моче, а также биомаркеры кардиотоксических эффектов.

Материал и методы. Проведено исследование образцов крови и мочи крыс после однократного введения 10 мг/кг НДМГ (1/16 DL₅₀) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-селективным детектированием высокого разрешения (ВЭЖХ-МС). Определение неметаболизированной формы НДМГ проводили также с использованием метода газовой хроматографии с масс-селективным детектированием с предварительной дериватизацией 4-пиридинкарбоксихальдегидом. Проведена оценка кардиотоксического действия НДМГ на модели изолированного сердца крысы при субхроническом внутрижелудочном введении в течение 28 дней в дозах 0,02; 0,2; 2,0 мг/кг.

Результаты. Установлено, что основными метаболитами НДМГ являются диметилгидразоны пиридоксаля (витамина В₆) и пировиноградной кислоты (пирувата). Показана возможность определения неметаболизированной формы НДМГ в крови и моче методом ВЭЖХ-МС, концентрации достигают 10–60 нг/мл плазмы крови и 200–2000 нг/мл. Применение НДМГ приводит к увеличению массового коэффициента сердца в дозе 2,0 мг/кг. В экспериментах *ex vivo* на сердце крысы показано кардиотоксическое действие НДМГ при субхроническом применении в дозе 0,2 мг/кг и выше, выражающееся в значительной дилатации коронарного русла и левого желудочка, развитии выраженного отрицательного инотропного и хронотропного эффектов, снижении максимальной скорости сокращения и расслабления левого желудочка, отражающее угнетение энергетического метаболизма миокарда.

Ограничения исследования. В работе проведено обнаружение биомаркеров после однократного внутрижелудочного введения НДМГ, токсикокинетические характеристики биомаркеров и их ретроспективность не оценивались.

Заключение. Основными метаболитами НДМГ при внутрижелудочном введении 1/16 DL₅₀ являются диметилгидразоны пиридоксаля (витамина В₆) и пировиноградной кислоты (пирувата). При субхроническом введении НДМГ обладает кардиотоксичностью в дозе 0,02 мг/кг и выше.

Ключевые слова: несимметричный диметилгидразин; НДМГ; ГХ-МС; ВЭЖХ-МС; биомаркер; изолированное сердце

Соблюдение этических стандартов. Исследование выполнено в соответствии с требованиями Европейской конвенции о защите позвоночных животных.

Для цитирования: Уколов А.И., Лаптев Д.С., Карманов Е.Ю., Каракашев Г.В., Криворотов Д.В., Богаченков А.С., Нечайкина О.В., Бобков Д.В., Петунов С.Г. Новые биомаркеры несимметричного диметилгидразина. *Токсикологический вестник*. 2022; 30(3): 182–190. <https://doi.org/10.47470/0869-7922-2022-30-3-182-190>

Для корреспонденции: Уколов Антон Игоревич, кандидат хим. наук, заместитель заведующего отделом токсикологии ФГУП «НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России, 188663, г.п. Кузьмоловский, Ленинградская область, Российская Федерация. E-mail: AntonUkolov@gmail.com

Участие авторов: Уколов А.И. – общая идея, планирование исследований; Лаптев Д.С., Нечайкина О.В., Богаченков А.С., Бобков Д.В. – выполнение исследований с изолированными органами; Карманов Е.Ю., Каракашев Г.В. – обнаружение и идентификация метаболитов НДМГ методом ВЭЖХ-МС; Криворотов Д.В., Богаченков А.С. – синтез стандарта метаболита; Петунов С.Г. – анализ данных.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила в редакцию: 12 апреля 2022 / Принята в печать: 25 мая 2022 / Опубликовано: 30 июня 2022

Ukolov A.I., Laptev D.S., Karmanov E.Y., Karakashev G.V., Krivorotov D.V., Bogachenkov A.S., Nechaikina O.V., Bobkov D.V., Petunov S.G.

New biomarkers for 1,1-dimethylhydrazine

FSUE "Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology", FMBA of Russia, g.p. Kuzmolovskii, 188663, Leningrad region, Russian Federation

Introduction. Despite the large-scale use of asymmetric dimethylhydrazine (UDMH) in the domestic rocket and space industry, its biomarkers of exposure in blood plasma and urine, as well as biomarkers of cardiotoxic effects, have not yet been described.

Material and methods. The study of blood and urine samples of rats after a single injection of 10 mg/kg UDMH (1/16 LD₅₀) was carried out by HPLC-MS. The determination of the non-metabolized form of UDMH was also carried out using the method of gas chromatography with mass-selective detection with preliminary derivatization with 4-pyridinecarboxaldehyde. The cardiotoxic effect of UDMH was assessed on a model of an isolated rat heart with subchronic intragastric administration for 28 days at doses of 0,02; 0,2; 2,0 mg/kg.

Results. It has been established that the main metabolites of UDMH are dimethylhydrazones of pyridoxal (vitamin B₆) and pyruvic acid (pyruvate). The possibility of determining the non-metabolized form of UDMH in blood and urine by HPLC-MS was shown, concentrations reach 10–60 ng/ml of blood plasma and 200–2000 ng/ml. The use of UDMH leads to an increase in the mass coefficient of the heart at a dose of 2,0 mg/kg. In ex vivo experiments on the rat heart, the cardiotoxic effect of UDMH was shown at subchronic use at a dose of 0,2 mg/kg and above, expressed in significant dilatation of the coronary bloodstream and left ventricle, the development of pronounced negative inotropic and chronotropic effects, and a decrease in the maximum rate of contraction and relaxation of the left ventricle, reflecting the inhibition of myocardial energy metabolism.

Limitations. In the work, biomarkers were detected after a single intragastric injection of NDMG, the toxicokinetic characteristics of biomarkers and their retrospectivity were not evaluated.

Conclusion. The main metabolites of UDMH with intravenous administration of 1/16 DL₅₀ are dimethylhydrazones of pyridoxal (vitamin B₆) and pyruvic acid (pyruvate). With subchronic administration, UDMH has cardiotoxicity at a dose of 0,02 mg/kg and above.

Keywords: *unsymmetric dimethylhydrazine; UDMH; GC-MS; HPLC-MS; biomarker; isolated heart*

Compliance with ethical standards. The study was carried out in accordance with the requirements of the European Convention for the Protection of Vertebrates.

For citation: Ukolov A.I., Laptev D.S., Karmanov E.Y., Karakashev G.V., Krivorotov D.V., Nechaikina O.V., Bogachenkov A.S., Bobkov D.V., Petunov S.G. New biomarkers for 1,1-dimethylhydrazine. *Toksikologicheskii vestnik (Toxicological review)*. 2022; 30(3): 182-190. <https://doi.org/10.47470/0869-7922-2022-30-3-182-190> (in Russian)

For correspondence: *Ukolov Anton Igorevich*, PhD, deputy head of toxicological department FSUE "Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology", FMBA of Russia, g.p. Kuzmolovskii, 188663, Leningrad region, Russian Federation. E-mail: AntonUkolov@gmail.com

Information about the authors:

Ukolov A.I., <https://orcid.org/0000-0002-2911-1260>; Scopus Author ID: 25321116600, Researcher ID: S-2545-2016

Laptev D.S., <https://orcid.org/0000-0002-3960-3058>

Krivorotov D.V., <https://orcid.org/0000-0002-6077-2534>

Bogachenkov A.S., <https://orcid.org/0000-0003-0797-3457>

Nechaykina O.V., <https://orcid.org/0000-0001-7151-7240>

Bobkov D.V., <https://orcid.org/0000-0002-1823-4361>

Petunov S.G., <https://orcid.org/0000-0001-6781-8315>

Author contribution: *Ukolov A.I.* – general idea, research planning; *Laptev D.S., Nechaykina O.V., Bobkov D.V.* – performing studies with isolated organs; *Karmanov E.Yu., Karakashev G.V.* – detection and identification of NDMG metabolites by HPLC-MS; *Krivorotov D.V., Bogachenkov A.S.* – synthesis of the metabolite standard; *Petunov S.G.* – data analysis.

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

Funding. The study had no sponsorship.

Введение

Несимметричный 1,1-диметилгидразин (НДМГ) является чрезвычайно токсичным веществом 1-го класса опасности. Он вызывает отравление при любом пути поступления в организм: вдыхании паров, попадании внутрь с пищей, водой и через кожу. В экспериментах выявлены, помимо общетоксического действия, канцерогенные и мутагенные эффекты НДМГ. В ранние сроки (через 24 ч) после однократного внутрижелудочного введения НДМГ самцам крыс наблюдались (независимо от дозы – 70; 140 или 200 мг/кг) биохимические эффекты, выразившиеся в увеличении степени апоптоза белых клеток крови [1]. В основном НДМГ используется в качестве высокоэнергетического ракетного топлива на отечественных межконтинентальных баллистических ракетах РЗ6М2 «Воевода», ракетах-носителях «Космос», «Циклон», «Протон»; американских – семейства «Титан»; французских – семейства «Ариан»; в двигательных установках пилотируемых кораблей и автоматических спутников, орбитальных и межпланетных станций, много-разовых космических кораблей [2]. Однако ранее он рассматривался как регулятор роста растений и полупродукт химического синтеза. [3]. Средне-смертельная доза НДМГ для лабораторных крыс при внутрибрюшинном введении составляет 104,5 мг/кг, при внутрижелудочном введении – по разным данным от 33 мг/кг до 155 мг/кг, при ингаляции паров в течение 4 ч смертельной является концентрация 0,11 г/м³. Пороговая доза острой токсичности для крыс – 1,94 мг/кг. Отмечено [2], что все производные гидразина имеют сходный механизм токсического действия и обладают нейро- и гепатотоксическими свойствами. Нейротоксический эффект обусловлен снижением содержания пиридоксальфосфата в тканях головного мозга, вызванным взаимодействием гидразинов с пиридоксалем, содержащимся в клетках.

Наиболее эффективным антидотом при отравлении НДМГ является пиридоксин (витамин В₆). Пиридоксин входит в перечень рекомендованных антидотных средств, утвержденных приказом Минздрава Российской Федерации [4].

Цель работы – выявление новых биомаркеров НДМГ. Согласно определению ВОЗ, «биомаркер экспозиции» – это экзогенное вещество/метаболит, определяемое в организме, а регистрируемое изменение в организме, наступающее в результате воздействия ксенобиотика, является «биомаркером эффекта» [5]. В качестве биомаркеров экспозиции к НДМГ в данной работе рассматривались аддукты ксенобиотика с эндогенными

низкомолекулярными соединениями, в качестве биомаркеров эффекта – функциональные показатели сердца. Совокупность нового знания о путях биотрансформации НДМГ в организме и кардиотропных эффектах позволит разработать новые высокочувствительные методы биомониторинга НДМГ.

Материал и методы

Несимметричный диметилгидразин (НДМГ, 1,1 – диметилгидразин, гептил) при нормальной температуре и давлении представляет собой бесцветную или слегка желтоватую прозрачную, сильно гигроскопичную жидкость с брутто-формулой (СН₃)₂N₂H₂, молекулярной массой 60,08 и плотностью 0,785 г/см³. Температура кипения плюс 63 °С, температура кристаллизации минус 57 °С.

Экспериментальные исследования на животных. Исследования проводились на самцах белых крыс массой 300–350 г, полученных из питомника «Рапполово» (Ленинградская область), с соблюдением правил биоэтики, утвержденных Европейской конвенцией о защите позвоночных животных. В помещениях, где содержались животные, поддерживали параметры микроклимата: температура 20 ± 1 °С, относительная влажность воздуха 60 ± 5%, режим освещения – 12 ч день / 12 ч ночь. Доступ к воде и корму был свободным.

Однократное внутрижелудочное введение НДМГ крысам. В остром эксперименте использовали одну группу животных ($n = 6$), которым внутрижелудочно вводили по 10 мг/кг НДМГ, что соответствует 1/16 DL₅₀. Отбор проб крови производили декапитацией через 30 мин после введения НДМГ, сбор мочи производили в течение 24 ч ($n = 3$).

Метаболическое профилирование образцов плазмы крови и мочи. Для метаболического профилирования образцов плазмы крови и мочи использовали жидкостный хроматограф Ассела (Thermo, США) с масс-спектрометрическим детектором Q Exactive (Thermo, США) с орбитальной ионной ловушкой, оборудованной колонкой Zorbax SB-C18 – 4,6 мм × 150 мм × 1,8 мкм.

Подготовка проб для ВЭЖХ-МС-анализа заключалась в депротенинизации образцов метанолом в соотношении 1 к 4 и центрифугировании. Каждую аликвоту образцов анализировали дважды в режиме регистрации положительно и отрицательно заряженных ионов. Градиентное элюирование осуществлялось использованием 0,1% раствора HCOOH в воде (Фаза А)

и ацетонитрила (Фаза Б). Скорость подачи подвижной фазы 0,4 мл/мин. На начальном этапе состав элюента (15% Б), затем, после 0,5 мин до 8 мин – от 15 до 90% фазы Б. От 8 до 10 мин – 90% фазы Б. От 10,1 до 14,00 мин – 15% Б. Объем вводимой пробы – 5 мкл.

Условия работы масс-спектрометрического детектора: (электроспрей в режиме положительной ионизации), температура проводящего капилляра 380 °С, температура распыляющего капилляра 300 °С, скорость потока газа-осушителя 45 у.е., скорость потока вспомогательного газа 20 у.е. Напряжение на капилляре 3,5 кВ.

В качестве стандартного образца НДМГ использован ГСО 8838-2006 с массовой долей основного вещества 99,5%.

Условия масс-спектрометрической регистрации метаболитов НДМГ (рис. 1): I – диметилгидразон пиридоксаля 210,12370 [M+H]⁺ (отклонение экспериментально измеренного m/z от теоретического составляет менее 1 ppm), время удерживания 9,14 мин, II – диметилгидразон пирувата 131,08150 [M+H]⁺ (отклонение экспериментально измеренного m/z от теоретического составляет 2 ppm), время удерживания 9,08 мин. Для количественного определения диметилгидразона пиридоксаля был синтезирован стандартный образец.

Исследования на модели изолированного сердца. При выборе уровней воздействия НДМГ исходили из данных литературы об установленной величине порога острого общетоксического действия при внутрижелудочном введении для белых крыс – 1,94 мг/кг (1/80 ЛД₅₀) [6], поэтому для субхронических экспериментов в качестве максимальной выбрана концентрация НДМГ в 2,0 мг/кг. Значения двух меньших уровней воздействия гептила отличались от указанной величины в 10 и 100 раз, составившие, соответственно, 0,2 мг/кг (1/800 ЛД₅₀) и 0,02 мг/кг (1/8000 ЛД₅₀).

Для изучения влияния несимметричного диметилгидразина на организм крысы при его субхроническом введении были сформированы три опытные и одна контрольная группа животных из 10 крыс:

- НДМГ-1 – 1-я опытная группа животных получала НДМГ в дозе 0,02 мг/кг;
- НДМГ-2 – 2-я опытная группа животных получала НДМГ в дозе 0,2 мг/кг;
- НДМГ-3 – 3-я опытная группа животных получала НДМГ в дозе 2,0 мг/кг;
- контроль – животные получали дистиллированную воду в том же объеме (0,5 мл), что и в опытных группах.

Введение НДМГ осуществлялось в водном растворе внутрижелудочно на протяжении 28 дней. По окончании курсового воздействия животные подвергались эвтаназии путем сотрясения головного мозга (удар по голове), после чего рассчитывали массовый коэффициент сердца и проводили исследование его сократительной активности *ex vivo* в соответствии с методикой Лангендорфа, описанной ранее [7].

Параметры сократительной активности сердца регистрировали с помощью системы PowerLab Data acquisition system 8/30 (ADInstruments, США) с последующей обработкой в программе LabChartProUpgrade 7.0. Регистрируемые показатели: давление перфузии (ДП), давление в левом желудочке (систолическое, диастолическое), частота сердечных сокращений (ЧСС), конечное диастолическое давление (КДД). После окончания эксперимента проводили расчет пульсового давления (ПД), интегрального показателя сократимости сердца за 1 мин (Int_{1мин}), первой производной давления по времени (+dP/dt и –dP/dt), характеризующей скорость развития сокращения и расслабления.

При анализе результатов оценивали динамику параметров сократительной и электрической активности сердца по сравнению со значениями в контрольной группе животных. Статистическую обработку результатов исследования проводили в программе GraphPad Prism 5.04. Для выявления значимости различий показателей в динамике применяли *T*-критерий Вилкоксона для связанных выборок, для выявления межгрупповых различий применяли *U*-критерий Манна–Уитни. Статистически значимыми считались различия при $p \leq 0,05$.

Синтез стандартного образца диметилгидразона пиридоксаля. Синтез выполняли в две стадии, на первой был получен пиридоксаль из пиридоксина, на второй – диметилгидразон пиридоксаля. Синтез пиридоксаля из пиридоксина: гидрохлорид пиридоксина (4,0 г; 19,5 ммоль) растворяли в 250 мл воды, в раствор при перемешивании добавляли активированный MnO₂ (18,4 г; 212 ммоль). Через 10 мин к реакционной массе в течение получаса по каплям добавляли концентрированную серную кислоту (21 мл; 394 ммоль). После этого реакционную массу выдерживали 3 ч при 70 °С. Затем реакционную массу нейтрализовали до pH ~ 7 добавлением концентрированного раствора KOH, воду упаривали при пониженном давлении, а остаток растирали с 200 мл этанола. Выпавший осадок, представляющий собой в основном неорганические соли, отфильтровывали на фильтре Шотта, а фильтрат упарили и получили

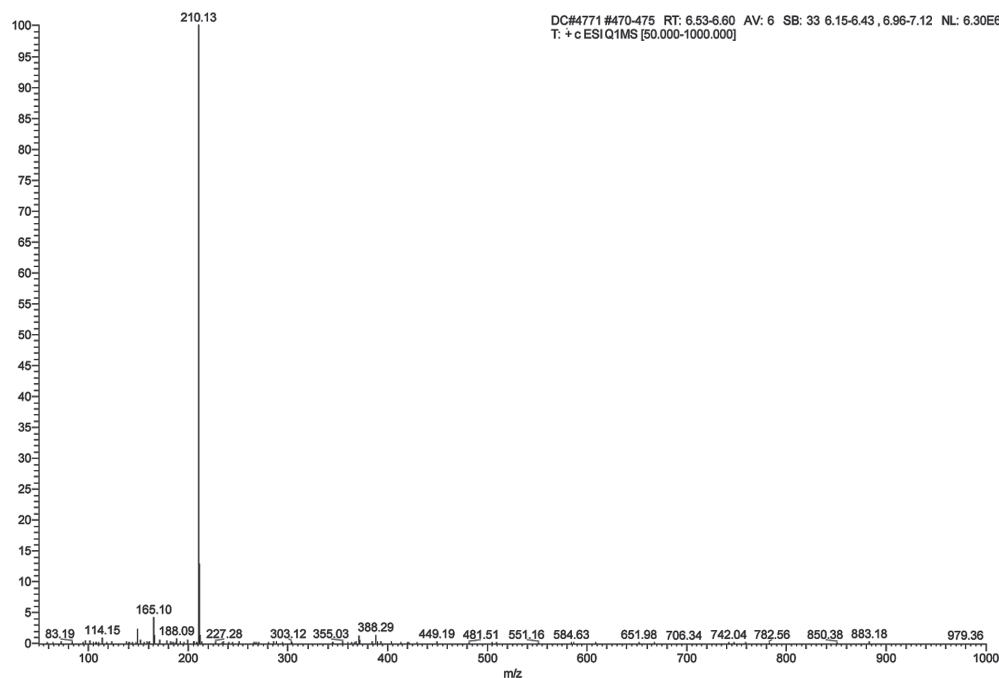


Рис. 1. Масс-спектр ионизацией электрораспылением диметилгидразона пиридоксала.

Fig. 1. Mass spectrum by electrospray ionization of pyridoxal dimethylhydrazone.

3,0 г тёмно-коричневого маслянистого остатка. Продукт использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

Синтез аддукта пиридоксала с НДМГ. Полученный на первой стадии пиридоксаль (0,1 г; 0,598 ммоль) растворили в этаноле (0,5 мл), добавили к раствору НДМГ (0,04 г; 0,718 ммоль). Реакционную массу перемешивали при комнатной температуре 12 ч, затем её разбавили 10 мл воды. Выпавший при добавлении воды осадок отфильтровали на фильтре Шотта. Водный фильтрат проэкстрагировали этилацетатом (3×5 мл), экстракты объединили, сушили над безводным Na_2SO_4 , затем упарили при пониженном давлении, получив 5 мг (4%) жёлтого маслянистого остатка, хроматограмма по общему ионному току которого приведена на рис. 1 (время удерживания 6,53 мин). Масс-спектр (см. рис. 1) основного анализа соответствует диметилгидразону пиридоксала. Вычислено $[\text{M}+\text{H}]^+$ 210,12; найдено $[\text{M}+\text{H}]^+$ 210,13.

Результаты и обсуждение

Биомаркеры экспозиции к НДМГ. В результате хромато-масс-спектрометрического исследования биологических проб крови и мочи крыс, подвергшихся внутрижелудочному введению 10 мг/кг НДМГ (1/16 DL_{50}), было установлено, что основными метаболитами НДМГ являются диметилгидразоны пиридоксала (витамина B_6) и пировиноградной кислоты (рис. 2).

Учитывая высокую реакционную способность НДМГ в реакции нуклеофильного присоединения по $\text{C}=\text{O}$ группе альдегидов или кетонов, нами

был сформирован перечень возможных субстратов плазмы крови и мочи. Обнаружение и идентификацию возможных аддуктов проводили с использованием ВЭЖХ-МС высокого разрешения [8, 9], поэтому некоторые возможные субстраты указаны с точностью до брутто-формулы, например, альдопентозы широко представленные в плазме крови. В табл. 1 приведены результаты такой идентификации. Кроме возможных биомаркеров в таблицу включены два исходных соединения – пиридоксаль и пируват для определения относительных концентраций аддуктов с НДМГ. Количественная оценка НДМГ проведена с использованием ГСО (см. «Материал и методы»), диметилгидразона пиридоксала – с использованием стандартного образца, остальных соединений – с использованием стандартного образца диметилгидразона пиридоксала в качестве внешнего стандарта.

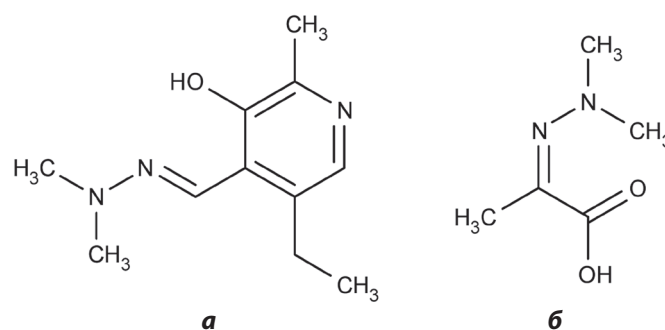


Рис. 2. Структурные формулы диметилгидразона пиридоксала (а) и син-изомера диметилгидразона пировиноградной кислоты (б).

Fig. 2. Structural formulas of pyridoxal dimethylhydrazone (a) and pyruvic acid dimethylhydrazone syn-isomer (b).

Таблица 1 / Table 1

Результаты определения биомаркеров НДМГ методом ВЭЖХ-МС
Results of determination of NDMG biomarkers by HPLC-MS method

Биомаркер	[M+H] ⁺ , теор.	Время удерживания, мин	Концентрация в плазме крови (оценка)	Концентрация в моче (оценка)
Диметилгидразон пиридоксала	210,12370	– *	850 нг/мл	30 мкг/мл
Диметилгидразон пировиноградной кислоты***	131,08150	9,08	–	1,7 мкг/мл
Диметилгидразон пиридоксальфосфата	290,09003	–	–	–
НДМГ	61,07602	5,6	10 нг/мл	200 нг/мл
Нативная пировиноградная кислота	89,02332	10,31	–	100 нг/мл
Нативный пиридоксаль	168,06552	8,14	50 нг/мл	–
Диметилгидразоны оксомаляных кислот**	145,09715	–	–	–
Диметилгидразоны оксвалериановых кислот	159,11280	–	–	–
Диметилгидразоны моносахаридов (альдопентоз)	223,12885	–	–	–
Диметилгидразон глицеральдегида	133,09715	–	–	–
Диметилгидразон N-формилглицина	146,09240	–	–	–
Диметилгидразоны ретиналя	327,27948	–	–	–
Нитрозодиметиламин	75,05529	–	–	–

Примечание. * – соединение не обнаружено, время удерживания не определено; ** – здесь и далее смесь изомеров; *** – в условиях анализа син- и антиизомеры хроматографически неразделимы.

Концентрация в крови продукта взаимодействия НДМГ с пиридоксалем в 600 раз превышает концентрацию свободной формы пиридоксала, то есть практически весь свободный пиридоксаль в системном кровотоке связывается в аддукт. Можно предположить, что небольшая концентрация свободного пиридоксала поддерживается за счет того, что реакция образования диметилгидразонов является равновесной. Стоит отметить, что продукты взаимодействия НДМГ с пиридоксальфосфатом не обнаружены даже в следовых количествах, что может свидетельствовать о полном прекращении метаболического пути образования пиридоксальфосфата в организме после введения НДМГ.

Основным метаболитом НДМГ в моче является аддукт с пировиноградной кислотой (концентрация достигает 1,7 мкг/мл), концентрация которого превышает нативную форму пирувата в 170 раз.

Нами была проведена сравнительная оценка биотрансформации НДМГ и другого компонента ракетных топлив – гидроксилamina. Гидроксилamin является реакционноспособным соединением, вступающим в различные реакции, среди которых окислительно-восстановительные, а также реакции образования оксимов (изонитрозосоединений) с альдегидами и кетонами, широко

представленными в крови и моче. Они проявляют способность к образованию комплексов с различными металлами. С точки зрения токсикологии оксимы являются малоизученными соединениями, за исключением оксимов, которые используются в качестве реактиваторов холинэстеразы при отравлениях фосфорорганическими соединениями.

Химические реакции, приводящие к образованию аддуктов НДМГ и гидроксилamina, практически идентичны, тем не менее внутрижелудочное введение ГА приводило к образованию широкого спектра оксимов различными кетонами и альдегидами крови и мочи: оксим глицеральдегида, оксим пировиноградной кислоты, оксим N-формилглицина, оксим глиоксалево́й кислоты и оксимы моносахаридов и нескольких 2-кетокислот [10, 11]. Однако в случае НДМГ не было обнаружено такого многообразия метаболитов, а так как среднесмертельная доза ГА (203,2 мг/кг) незначительно превышает DL₅₀ НДМГ – 155 мг/кг, то можно сделать вывод об отсутствии общности патогенеза отравлений гидроксилaminом и НДМГ.

Биомаркеры эффекта НДМГ. Появление сложных технологий в молекулярной и клеточной биологии привело к быстрому развитию

Таблица 2 / Table 2

Коэффициенты массы сердца (отношение массы органа (мг) к общей массе (г) тела) у крыс-самцов через 28 дней внутрижелудочного введения НДМГ
Mass coefficients of the heart (ratio of organ mass (mg) to total mass (g) in male rats after 28 days of intragastric administration of UDMH)

Группа животных	Коэффициент массы сердца
Контроль	4,31 ± 0,10
НДМГ-1	4,21 ± 0,15
НДМГ-2	4,20 ± 0,22
НДМГ-3	4,81 ± 0,18*

Примечание. Здесь и в табл. 3: * – статистически значимое отличие от контрольной серии экспериментов ($p \leq 0,05$).

«токсикологии *in vitro*», в результате чего основное внимание токсикологов при исследовании влияния ксенобиотиков на организм, особенно при их длительном воздействии в малых и ультрамалых дозах, переместилось с системного (организменного) уровня организации на орган-ный, клеточный и молекулярный.

Применение миографических методик с использованием изолированных органов (*ex vivo*) является перспективным направлением оценки функции в токсикологических исследованиях. Поскольку чувствительность различных органов и систем организма к токсиканту не одинакова, данный этап исследований необходим для развернутой характеристики токсичности исследуемого вещества [12]. Важнейшее значение с практической точки зрения имеет использование модели изолированного сердца, играющего лимитирующую роль в транспорте кислорода и распространении веществ в организме. Одним из общепринятых методических подходов к исследованию

сократимости миокарда и оценки кардиотропных эффектов фармакологических средств в эксперименте является модель изолированного сердца по Лангендорфу. Основное преимущество подобных исследований по сравнению с работами, выполняемыми *in vivo*, состоит в том, что миокард в такой модели выведен из-под влияния регуляторных систем целого организма. Это даёт возможность обнаружить изменения биохимических процессов и параметров функционирования миокарда, зависящие исключительно от нарушений его структуры и метаболизма [13].

В токсикологических исследованиях интегральным показателем для оценки состояния внутренних органов является коэффициент массы, который позволяет обнаруживать органы-мишени токсиканта. При анализе коэффициента массы сердца, установлено, что внутрижелудочное введение НДМГ в течение 28 дней приводило к статистически значимому по сравнению с контролем увеличению сердца в группе НДМГ-3, получавшей НДМГ в дозе 2,0 мг/кг (табл. 2). Полученные результаты могут свидетельствовать о развитии дистрофии левого желудочка и согласуются с данными литературы о кардиотоксическом действии НДМГ [6].

На основании полученных данных можно предположить, что несимметричный диметилгидразин в дозах 0,02 и 0,2 мг/кг (опытная группа НДМГ-1 и НДМГ-2) не обладает кардиотоксическим действием, поскольку по данному показателю не было выявлено различий между опытной и контрольной группами животных.

Однако в результате исследования на модели изолированного сердца крысы показано, что субхроническое применение НДМГ во всех исследуемых дозах приводит к угнетению сократительной активности сердца (табл. 3).

В экспериментах *ex vivo* выявлено, что НДМГ вызывает дилатацию коронарных сосу-

Таблица 3 / Table 3

Параметры сократительной активности изолированного сердца крысы при субхроническом внутрижелудочном введении НДМГ в течение 28 дней, абсолютные данные в виде $M \pm SE$, $n = 10$
Parameters of contractile activity of an isolated rat heart with subchronic intragastric administration of NDMG for 28 days. Absolute data are presented in the form of $M \pm SE$, $n = 10$

Группа животных	ДП, мм рт. ст.	$Int_{1\text{мин}} ed^2$	ЧСС, уд. в 1 мин	ПД, мм рт. ст.	+dP/dt, мм рт. ст. / с	-dP/dt, мм рт. ст. / с	КДД, мм рт. ст.
Контроль	148,6 ± 5,1	1880,4 ± 78,7	214,5 ± 6,9	93,6 ± 4,3	2706,0 ± 82,1	-1858,0 ± 51,8	4,9 ± 0,8
НДМГ-1	80,4 ± 6,5*	1050,0 ± 60,4*	213,7 ± 4,4	64,12 ± 4,7*	2453,0 ± 306,2	-1194,0 ± 88,1*	3,7 ± 0,4
НДМГ-2	68,5 ± 4,8*	1210,0 ± 70,1*	187,0 ± 7,1*	70,9 ± 3,7*	1412,0 ± 112,2*	-1198,0 ± 61,3*	2,9 ± 0,4*
НДМГ-3	85,8 ± 7,6*	1156,0 ± 54,7*	194,5 ± 10,3	64,4 ± 4,0*	1661,0 ± 284,1*	-1149 ± 57,9*	1,3 ± 0,3*

дов сердца, о чем свидетельствует выявленное снижение давления перфузии в опытных группах (НДМГ-1, НДМГ-2, НДМГ-3) по сравнению с контролем на 46, 54, 42% соответственно ($p \leq 0,05$). Значительное снижение давления в коронарном русле может приводить к угнетению трофики миокарда. Вследствие развития отрицательного хронотропного и инотропного эффектов значительно снижен интегральный показатель сократительной активности сердца в группах НДМГ-1, НДМГ-2, НДМГ-3 по сравнению с контролем на 44,2, 35,7, 38,5% соответственно ($p < 0,05$). Кроме того, субхроническое применение НДМГ приводит к дозозависимому снижению конечного диастолического давления на 24,5, 40,8 и 73,5% от контроля в группах НДМГ-1, НДМГ-2, НДМГ-3, что может определять снижение пульсового давления изолированного сердца животных.

Показано, что НДМГ вызывает снижение показателей максимальной скорости сокращения левого желудочка изолированного сердца на 47,8 и 38,6% по сравнению с контролем в группах НДМГ-2 и НДМГ-3 соответственно ($p < 0,05$). Гептил также приводит к снижению максимальной скорости расслабления левого желудочка на 35,7, 35,5 и 38,2% по сравнению с контролем в группах НДМГ-1, НДМГ-2 и НДМГ-3 ($p < 0,05$). Угнетение данных показателей свидетельствует о токсическом влиянии субхронического применения НДМГ на энергетический метаболизм миокарда.

Таким образом, в эксперименте показано, что НДМГ обладает кардиотропным действием и приводит к снижению функциональных показателей изолированного сердца, начиная с дозы 0,02 мг/кг. Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что применяемая модель

изолированного сердца *ex vivo* является адекватной и обладает высокой чувствительностью в сравнении с методами *in vivo*. На основании полученных результатов можно считать кардиотоксичными дозы НДМГ уровня 0,2 мг/кг.

Заключение и выводы

1. Биомониторинг воздействия НДМГ на организм людей, контактирующих с ним, целесообразно проводить на основе количественного определения НДМГ в крови и моче, диметилгидразона пиридоксаля в крови и диметилгидразона пировиноградной кислоты в моче методом ВЭЖХ-МС. При однократном внутривенном введении 10 мг/кг НДМГ через 30 мин концентрации достигают следующих значений: 10–60 нг/мл НДМГ в плазме крови и 200–2000 нг/мл в моче, диметилгидразона пиридоксаля – 850 нг/мл в плазме крови и 30 мкг/мл в моче, диметилгидразона пировиноградной кислоты – 1,7 мкг/мл в моче. Диметилгидразон пировиноградной кислоты в плазме крови не обнаружен.

2. В экспериментах *ex vivo* на сердце крысы показаны кардиотропные эффекты НДМГ при субхроническом применении во всех исследуемых дозах, начиная с 0,02 мг/кг. Кардиотоксическое действие НДМГ при субхроническом применении показано в дозе 0,2 мг/кг и выше, выражающееся в значительной дилатации коронарного русла и левого желудочка, развитии выраженного отрицательного инотропного и хронотропного эффектов, снижении максимальной скорости сокращения и расслабления левого желудочка, отражающем угнетение энергетического метаболизма миокарда. Субхроническое применение НДМГ в дозе 2,0 мг/кг приводит к увеличению коэффициента массы сердца.

ЛИТЕРАТУРА

- Иванов С.Д., Колбасов С.Е., Ямшанов В.А., Кованько Е.Г., Монахов А.С., Мелихова М.В. и др. Экспрессная оценка токсикогеномных эффектов несимметричного диметилгидразина. *Токсикологический вестник*. 2009; 3 (96): 11–7.
- Бугаев П.А., Антушевич А.Е., Рейнюк В.Л., Башарин В.А., Зацепин В.В. Гидразин и его производные: токсикологическая характеристика. *Современные проблемы науки и образования*. 2017; 4: 31.
- U.S. Environmental Protection Agency. Health and Environmental Effects Profile for 1,1-Dimethylhydrazine. EPA/600/x-84/134. *Environmental Criteria and Assessment Office, Office of Health and Environmental Assessment, Office of Research and Development, Cincinnati, OH*. 1984.
- Антушевич А.Е., Башарин В.А., Рейнюк В.Л., Бугаев П.А. Эффективность инозина глицил-цистеинил-глутамата динатрия и пиридоксина гидрохлорида при остром отравлении несимметричным диметилгидразином. *Вестник Российской Военно-медицинской академии*. 2018; 1(61): 164–7.
- Гигиенические критерии состояния окружающей среды: совмест. изд. Программы ООН по окружающей среде, Междунар. орг. труда и ВОЗ. 155: *Биомаркеры и оценка риска: концепции и принципы* [пер. с англ.]. Москва; 1996.
- Ягужинский Л.С., Манухов И.В., Вагапова Э.Р. *Экспериментальные исследования влияния низких концентраций гептила и продуктов его гидролиза на воду и биологические объекты*. Междисциплинарный Центр Фундаментальных Исследований (МФТИ), г. Долгопрудный; 2016.
- Лаптев Д.С., Петунов С.Г., Бобков Д.В., Радиков А.С. Влияние β-эндорфина на функциональную активность изолированного сердца крысы. Роль δ-опиоидных рецепторов. *Регионарное кровообращение и микроциркуляция*. 2015; 3(55): 66–71.
- Зенкевич И.Г., Уколов А.И., Кушакова А.С., Густылева Л.К. Возможности идентификации изомерных алкиларенов с использованием аддитивных схем оценки газохроматографических индексов удерживания. *Журнал аналитической химии*. 2011; 66(12): 1282–9.
- Зенкевич И.Г., Уколов А.И. Кодирование особенностей структуры органических соединений для оценки хроматографических индексов удерживания с использованием аддитивных схем. *Журнал структурной химии*. 2010; 51(4): 671–81.
- Уколов А.И., Радиков А.С. Определение гидроксилламина в плазме крови и моче методом газовой хромато-масс-спектрометрии. *Вестник СПбГУ. Физика и химия*. 2017; 4(62): 337–45.
- Уколов А.И., Радиков А.С. Токсикометаболика гидроксилламина *Медицина экстремальных ситуаций*. 2019; 21(1): 184–92.
- Куценко С.А. *Основы токсикологии*. СПб.: Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова; 2002.
- Минасян С.М., Галагузда М.М., Сонин Д.Л., Боброва Е.А., Зверев Д.А., Королев Д.В. и др. Методика перфузии изолированного сердца крысы. *Регионарное кровообращение и микроциркуляция*. 2009; 4(32): 54–9.

REFERENCES

- Ivanov S.D., Kolbasov S.E., Yamshanov V.A., Kovan'ko E.G., Monahov A.S., Melihova M.V. et al. Express assessment of toxicogenomic effects of asymmetric dimethylhydrazine. *Toksikologicheskij vestnik*. 2009; 3(96): 11–7. (in Russian)
- Bugaev P.A., Antushevich A.E., Rejnyuk V.L., Basharin V.A., Zacepin V.V. Hydrazine and its derivatives: toxicological characteristics. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2017; 4: 31. (in Russian)
- U.S. Environmental Protection Agency. Health and Environmental Effects Profile for 1,1-Dimethylhydrazine. *Environmental Criteria and Assessment Office, Office of Health and Environmental Assessment, Office of Research and Development, Cincinnati, OH*. EPA/600/x-84/134.1984.
- Antushevich A.E., Basharin V.A., Rejnyuk V.L., Bugaev P.A. Efficacy of inosine glycyl-cysteiny-glutamate disodium and pyridoxine hydrochloride in acute poisoning with asymmetric dimethylhydrazine. *Vestnik Rossijskoj Voенno-medicinskoj akademii*. 2018; 1(61): 164–7. (in Russian)
- Environmental health criteria 155. Biomarkers and Risk Assessment: Concepts and Principles. Moscow; 1996.
- Yaguzhinskij L.S., Manuhov I.V., Vagapova E.R. *Experimental studies of the effect of low concentrations of heptyl and its hydrolysis products on water and biological objects [Experimentalnye issledovaniya vliyaniya nyzkikh koncentratsii heptila i produktov ego gidroliza na vodu i biologicheskie ob'ekty]*. Mezhdisciplinarnyj Centr Fundamental'nyh Issledovaniy (MFTI), g. Dolgoprudny. 2016. (in Russian)
- Laptev D.S., Petunov S.G., Bobkov D.V., Radilov A.S. The influence of β -endorphin on the functional activity of the isolated heart of rat. The role δ -opioid receptors. *Regionarnoe Krovoobrashchenie i Mikrocirkuljacija*. 2015; 3(55): 66–71. (in Russian)
- Zenkevich I.G., Ukolov A.I., Kushakova A.S., Gustyleva L.K. Identification of isomeric alkylarenes with the use of additive relations for the evaluation of gas-chromatographic retention indices. *Zhurnal Analiticheskoi Himii*. 2011; 66(12): 1165–72. (in Russian)
- Zenkevich I.G., Ukolov A.I. Coding of the structural features of organic compounds for the estimation of chromatographic retention indices with the use of additive schemes. *Zhurnal Strukturnoi Himii*. 2010; 51(4): 642–51. (in Russian)
- Ukolov A.I., Radilov A.S. Determination of hydroxylamine in blood plasma and urine by gas chromatography mass spectrometry. *Vestnik SPbGU. Fizika i himiya*. 2017; 4(62): 337–45. (in Russian)
- Ukolov A.I., Radilov A.S. Toxic metabolomics of hydroxylamine. *Medicina ekstremal'nyh situacij*. 2019; 21(1): 184–92. (in Russian)
- Kucenko S.A. *Basics of toxicology [Osnovy toksikologii]*. SPb.: Voенno-medicinskaya akademiya im. S.M. Kirova; 2002. (in Russian)
- Minasyan S.M., Galagudza M.M., Sonin D.L., Bobrova E.A., Zverev D.A., Korolev D.V. et al. Perfusion technique of isolated rat heart. *Regionarnoe Krovoobrashchenie i Mikrocirkuljacija*. 2009; 4(32): 54–9. (in Russian)

ОБ АВТОРАХ:

Уколов Антон Игоревич (Ukolov Anton Igorevich), кандидат хим. наук, заместитель заведующего отделом токсикологии ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России, 188663, г.н. Кузьмоловский, Ленинградская область, Российская Федерация. E-mail: AntonUkolov@gmail.com

Лаптев Денис Сергеевич (Laptev Denis Sergeevich), кандидат биол. наук, заведующий лабораторией экстремальной физиологии ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России, 188663, г.н. Кузьмоловский, Ленинградская область, Российская Федерация. E-mail: lapden@mail.ru

Карманов Евгений Юрьевич (Karmanov Evgeny Yurievich), научный сотрудник лаборатории общей токсикологии и гигиенического регламентирования ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России, 188663, г.н. Кузьмоловский, Ленинградская область, Российская Федерация. E-mail: karmanov@gpetch.ru

Каракашев Георгий Васильевич (Karakashev Georgy Vasilyevich), кандидат биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории аналитической токсикологии ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России, 188663, г.н. Кузьмоловский, Ленинградская область, Российская Федерация. E-mail: karakashev@gpetch.ru

Криворотов Денис Викторович (Krivorotov Denis Viktorovich), кандидат хим. наук, заведующий лабораторией химического моделирования ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России, 188663, г.н. Кузьмоловский, Ленинградская область, Российская Федерация. E-mail: krivorotov.dv@gpetch.ru

Нечайкина Ольга Валерьевна (Nechaykina Olga Valeryevna), старший научный сотрудник лаборатории экстремальной физиологии ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России, 188663, г.н. Кузьмоловский, Ленинградская область, Российская Федерация. E-mail: olga2278@mail.ru

Бобков Дмитрий Владимирович (Bobkov Dmitry Vladimirovich), старший научный сотрудник лаборатории экстремальной физиологии ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России, 188663, г.н. Кузьмоловский, Ленинградская область, Российская Федерация. E-mail: bdv21@yandex.ru

Петунов Сергей Гервасиевич (Petunov Sergey Gervasievich), кандидат мед. наук, доцент, заведующий научно-организационным отделом ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России, 188663, г.н. Кузьмоловский, Ленинградская область, Российская Федерация. E-mail: sergey-petunov@mail.ru

