

## ОСОБЕННОСТИ ЭМБРИОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ДИИЗОНОНИЛФТАЛАТА В ЭКСПЕРИМЕНТАХ НА ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

ГРЫНЧАК В.А., СЫЧИК С.И., ВЛАСЕНКО Е.К., ИЛЮКОВА И.И., АФОНИН В.Ю.

Научно-практический центр гигиены, г. Минск, Республика Беларусь

Вестник ВГМУ. – 2018. – Том 17, №4. – С. 72-77.

## THE PECULIARITIES OF THE EMBRYOTOXIC ACTION OF DIISONONYL PHTHALATE IN EXPERIMENTS ON LABORATORY ANIMALS

GRYNCHAK V.A., SYCHIK S.I., VLASENKO E.K., IL'YUKOVA I.I., AFONIN V.Y.

Scientific-Practical Centre of Hygiene, Minsk, Republic of Belarus

Vestnik VGMU. 2018;17(4):72-77.

### Резюме.

Изучение особенностей токсического действия диизононилфталата на лабораторных животных показало иницирование тератогенных эффектов у крыс при внутрижелудочном введении самкам на протяжении периода беременности. Уровень воздействия 10000 мг/кг фталата характеризовался увеличением общей постимплантационной и эмбриональной смертности, наличием множественных (сочетанных) пороков развития эмбрионов. Постнатальное развитие потомства характеризовалось нарушением функции эндокринной системы: щитовидной и половых желез, приводящим к развитию первичной тестикулярной недостаточности и тиреотоксикозу. В эксперименте установлена максимально недействующая доза 10 мг/кг. Элементами механизма эмбриотоксического действия диизононилфталата являются нарушения процессов клеточной дифференцировки, ДНК-повреждающее действие и цитотоксические свойства фталата, которые приводили к образованию полиплоидных клеток в селезенке при однократном внутрибрюшинном воздействии фталата в опытах на белых мышах, и к накоплению лейкоцитов периферической крови с нарушениями генетического аппарата и дифференцировки (накопление сегментоядерных клеток, микроядер, клеток с признаками некроза) при субхроническом внутрижелудочном введении самкам белых крыс.

*Ключевые слова:* диизононилфталат (ДИНФ), эмбриотоксичность, эндокринная система, гормоны, клеточный цикл.

### Abstract.

The study of the peculiarities of diisononyl phthalate toxic effects on laboratory animals showed the initiation of teratogenic effects in rats on intragastric administration to females during the gestation period. The exposure level of 10,000 mg/kg of phthalate was characterized by an increase in total postimplantation and embryonic mortality, the presence of multiple (combined) malformations of embryos. Postnatal development of the offspring was characterized by the disturbance of the endocrine system function: the thyroid and sex glands, leading to the development of primary testicular insufficiency and thyrotoxicosis. In the experiment, the most inactive dose was 10 mg/kg. Elements of the embryotoxic action mechanism of diisononyl phthalate are the disturbances in the processes of cell differentiation, DNA damaging effect and cytotoxic properties of phthalate, which led to the formation of polyploid cells in the spleen on single intraperitoneal impact of phthalate in experiments on white mice, and accumulation of peripheral blood leukocytes with disorders of the genetic apparatus and differentiation (accumulation of segmented cells, micronuclei, cells with the signs of necrosis) on subchronic intragastric introduction to male white rats.

*Key words:* diisononyl phthalate, DINP, embryotoxicity, endocrine system, hormones, cell cycle.

В настоящее время широкое применение для производства изделий на полимерной основе находит новое соединение – диизононилфталат (ДИНФ), химические свойства которого позволяют отказаться от существующих пластификаторов – дибутилфталата и диоктилфталата.

По данным Всемирной организации здравоохранения, фталаты оказывают негативное воздействие на эндокринную и нервную системы, обладают способностью индуцировать ряд отдаленных эффектов, включая канцерогенные. В частности, соединения с такими свойствами присутствуют в изделиях медицинского назначения, что требует проведения полной токсикологической оценки и гигиенического регламентирования ДИНФ в данном виде продукции.

Одним из компонентов изучения возможного отрицательного воздействия вредного химического фактора является идентификация опасности репродуктивной токсичности, что достигается путем экстраполяции на человека экспериментальных данных, полученных в опытах на целостном организме животного. Объектом исследования послужил диизононилфталат – сложный эфир фталевой кислоты, представляющий собой прозрачную бесцветную маслянистую жидкость, без запаха, практически нерастворимую в воде, регистрационный № CAS: 28553-12-0, эмпирическая формула  $C_{26}H_{42}O_4$ , молярная масса 418,62 г/моль, плотность 0,97 г/см<sup>3</sup>.

Целью настоящих исследований являлось изучение отдельных аспектов механизма влияния диизононилфталата на репродуктивную функцию белых крыс с учетом изменений, возникающих в постнатальном развитии.

## Материал и методы

Изучение эмбриотоксичности проводили по методу, предложенному А.А. Динерман [1]. Суть данного метода заключается в комбинированной схеме постановки эксперимента по изучению эмбриотоксического и тератогенного действия с учетом состояния потомства в постнатальном периоде при многократном внутрижелудочном введении изучаемого фталата в дозах 10, 100, 1000 и 10000 мг/кг самкам белых крыс на протяжении периода беременности. Наличие аномалий развития внутренних органов эмбрионов определяли с помощью метода сагиттальных срезов, предложенного W. Wilson в модификации [2]. Все срезы просматривали с помощью бино-

кулярной лупы МБС-1 (Россия). Изучение состояния потомства в постнатальном периоде проводили с использованием показателей физического развития (массы и длины тела), гормонального статуса (наборы ХЕМА, Россия, автоматический фотометр для микропланшетов ELX808 BioTek Instruments Inc, США), функциональных и морфометрических показателей гонад. Морфофункциональные показатели гонад изучали по показателям общей концентрации сперматозоидов, концентраций подвижных и неподвижных сперматозоидов, средней скорости подвижных сперматозоидов при помощи спермоанализатора БИОЛА АФС-500-2 (Россия).

Для более детального изучения механизмов (особенностей) токсического действия ДИНФ применяли цитогенетические методы исследования. При однократном внутрибрюшинном введении ДИНФ в концентрации 2000 мг/кг через 24 часа проведен метафазный анализ аберраций хромосом в клетках костного мозга и селезенки аутбредных белых мышей массой 18-20 грамм [3]. Контрольная и опытная группы содержали по 3 особи самцов, от каждого животного учитывали 100 метафаз в костном мозге и селезенке. Перед взятием костного мозга и селезенки животным за 1,5-2 часа для накопления метафаз вводили внутрибрюшинно 0,1% раствор колхицина в объеме 0,2 мл/мышь.

Цитогенетическое исследование мазков крови (по 300 лейкоцитов на каждый уровень доз) производили на светооптическом уровне при помощи микроскопа Zeiss (Германия) при субхроническом (5 дней в неделю в течение 2-месячного опыта) воздействии доз 100, 1000 и 10000 мг/кг ДИНФ на организм самцов белых крыс.

Результаты исследований обрабатывали общепринятыми методами. Различия между контрольными и опытными группами считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ . Обращение с животными соответствовало основным этическим принципам надлежащей лабораторной практики [4].

## Результаты и обсуждение

На протяжении эксперимента (период беременности и роды) гибель и клинические признаки интоксикации самок крыс в опытных группах и контроле отсутствовали. Изучение эмбрионального развития потомства крыс в дозе 10000 мг/кг достоверно показало снижение числа живых

эмбрионов и среднего числа особей в помете на одну самку по сравнению с контролем. Увеличилось число погибших эмбрионов, как следствие достоверно изменилась общая эмбриональная и постимплантационная смертность. В остальных опытных группах показатели оставались в пределах нормального эмбриогенеза.

При внешнем осмотре эмбрионов и при изучении состояния их внутренних органов методом сагиттальных срезов контрольной группы и группы при воздействии 10 мг/кг ДИНФ отклонений от анатомической нормы не обнаружено. В опытной группе при воздействии 100 мг/кг фталата установлено уменьшение размера глазных яблок у 5 эмбрионов (микрофтальмия, 4,8%). Эта же аномалия развития наблюдалась и в группах, получавших 1000 и 10000 мг/кг изучаемого соединения, при этом выявлен ряд аномалий развития плодов: частичное отсутствие свода черепа, черепно-мозговая грыжа, гидроцефалия, анэнцефалия, микрогнатия, гипоплазия нижней доли легкого, отсутствие межжелудочковой перегородки, эвентрация кишечника и/или печени. Доза 10000 мг/кг ДИНФ вызывала множественные пороки развития, которые характеризовались сочетанием эвентрации кишечника и/или печени, микрофтальмии, анэнцефалии, гидроцефалии, акронии, отсутствием межжелудочковой перегородки. Таким образом, морфологически были обнаружены признаки выраженного негативного (тератогенного) действия на плод.

Наблюдения за процессом постнатального развития крысят проводили, начиная со дня рождения до 60-дневного возраста. Установлено, что по параметрам физического развития подопытные крысята не отличались от контрольных. Так, независимо от групповой принадлежности, отлипание ушной раковины у крысят наступало на 2-3 день жизни, обрастание шерстью на 5-6 дни, прорезывание резцов на 8-9 день жизни, открытие глаз – на 13-16 день жизни.

При изучении показателей состояния репродуктивной системы потомства (самцы крыс) на 60-й день жизни произведено умерщвление животных подопытных групп методом мгновенной декапитации. Макроскопическое обследование семенников и придатков у животных всех групп не обнаружило видимой патологии. В подопытных группах не наблюдалось достоверных отклонений показателей, характеризующих генеративную функцию – ориентировочные коэффициенты масс семенников и придатков, общей

концентрации, концентрации подвижных и неподвижных сперматозоидов, средней скорости подвижных сперматозоидов.

Результаты исследования гормонального статуса потомства белых крыс свидетельствуют о том, что воздействие ДИНФ в дозах 100 и 1000 мг/кг вызывает у самцов достоверное повышение уровней общего тироксина в 2,3 и 2,0 раза, тиреотропного гормона – в 2,3 и 2,1 раза, снижение концентрации тестостерона в 2,9 и 2,3 раза по сравнению с контролем. В диапазоне изученных доз фталат не оказывал влияния на уровни свободного трийодтиронина и свободного тироксина, кортизола, дигидроэпиандростерона-сульфата, 17-ОН-прогестерона, прогестерона, эстрадиола, лютеотропного и фолликулостимулирующего гормонов, тиреоглобулина у животных в постнатальном периоде. Доза 10 мг/кг ДИНФ не приводила к сдвигам гормонального статуса самцов потомства и в условиях данного эксперимента является максимально недействующей.

Как следует из полученных данных, у животных в постнатальном периоде развития изучаемый фталат вызывает гиперфункцию щитовидной железы вторичного характера с локализацией патологического процесса в звене управления: гипоталамусе и/или гипофизе. На это прежде всего указывает увеличение уровня тиреотропного гормона на 134% и 108% с одновременным повышением количества общего тироксина на 127% и 102% в дозах 100 и 1000 мг/кг ДИНФ, соответственно. Указанные гормональные сдвиги свидетельствуют о развитии тиреотоксикоза [5], вызванного повреждающим действием ДИНФ в период эмбриогенеза.

Важной особенностью токсического действия ДИНФ является его антиандрогенная активность, которая проявляется у самцов потомства снижением уровня тестостерона на 66% и 56% при воздействии доз 100 и 1000 мг/кг, соответственно. Принимая во внимание тенденцию к увеличению продукции гонадотропинов (лютеотропного и фолликулостимулирующего гормонов) при воздействии указанных доз ДИНФ, такие нарушения в системе «гипоталамус-гипофиз-половые железы» указывают на наличие первичной тестикулярной недостаточности [5].

Таким образом, исследование гормонального статуса потомства белых крыс выявило сдвиги постнатального развития, вызываемого воздействием ДИНФ в период беременности, которые проявляются нарушением функции эн-

докринной системы: щитовидной и половых желез, затрагивая систему обратной регуляции «головной мозг-эндокринная железа». Изменение функционирования структур головного мозга у потомства может быть связано с наличием тератогенных эффектов изучаемого соединения – анэнцефалией, гидроцефалией, акранией, зарегистрированных в период эмбриогенеза.

Анализ цитогенетических препаратов костного мозга и селезенки показал, что ДИНФ в дозе 2000 мг/кг при однократном внутрибрюшинном введении белым крысам не вызывает через 24 часа достоверного увеличения аберраций хромосом ( $p > 0,05$ ) в анализируемых органах. Так, на 100 учитываемых клеток процент аберрантных метафаз костного мозга составил в контроле – 1,0 [1,0;2,0], в опытной группе – 1,0 [1,0;3,0], в селезенке составил в контроле – 1,0 [0,0;1,0], в опытной группе – 0,0 [0,0;1,0]. При этом аберрации представлены одиночными фрагментами хромосом.

На цитогенетических препаратах также проведен анализ числа клеток с признаками карioreксиса (апоптоза) и полиплоидов на 100 учитываемых метафаз. Установлено отсутствие клеток с признаками апоптоза (интерфазный тип гибели) в костном мозге контрольной и опытной групп. В селезенке, для клеток которой характерна интерфазная гибель, обнаружено, что в опытной группе количество клеток с признаками апоптоза составило 1,0 [1,0;1,0], что оказалось в 5 раз меньше ( $p < 0,05$ ) чем в контрольной – 5,0 [4,0;6,0].

Подсчет числа полиплоидов показал, что в костном мозге, где характерно присутствие большого числа таких клеток в норме, различий между контролем – 47,0 [41,0;50,0] и опытной группой – 45,0 [38,0;46,0] не обнаружено. В селезенке лабораторных животных опытной группы зарегистрировано увеличение числа полиплои-

дов в 4 раза по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ): в опыте – 8,0 [6,0;10,0], в контрольной группе – 2,0 [1,0;3,0] на 100 метафаз.

Следовательно, при однократном внутрибрюшинном введении белым мышам ДИНФ не проявляет мутагенных свойств (не увеличивает число хромосомных аберраций в костном мозге и селезенке), но приводит к изменению процессов деления, дифференцировки и гибели клеток селезенки, что может оказывать влияние на кроветворение и иммунитет. Образование полиплоидных клеток может считаться маркером токсического действия изучаемого фталата.

Цитогенетический анализ мазков крови показал, что внутрижелудочное введение ДИНФ в условиях субхронического опыта вызывало у самцов белых крыс увеличение количества лейкоцитов с нарушениями генетического аппарата (табл. 1).

Как следует из таблицы 1, воздействие изучаемого фталата в дозах 100 мг/кг и 10000 мг/кг приводило к увеличению количества клеток с микроядрами 4 типа в 10,7 раза и 6,4 раза ( $p < 0,05$ ), соответственно. Доза 100 мг/кг ДИНФ характеризуется достоверным увеличением количества сегментоядерных лейкоцитов в 3,2 раза по отношению к контролю. При воздействии доз 1000 мг/кг и 10000 мг/кг фталата зарегистрировано увеличение количества лейкоцитов с признаками некроза в 6,1 раза и 5,1 раза ( $p < 0,05$ ), соответственно.

Таким образом, в диапазоне изученных доз ДИНФ способен вызывать различные повреждающие эффекты генетических структур: так, наименьшая испытанная доза 100 мг/кг усиливает процессы клеточной дифференцировки (пролиферации) с одновременным увеличением количества микроядер. Увеличение уровня воздействия до 1000 мг/кг приводит к реализации цитотоксического действия фталата – регистрируется повы-

Таблица 1 – Показатели состояния генетических структур лейкоцитов крови белых крыс при внутрижелудочном введении ДИНФ в субхроническом опыте,  $M \pm m$

Доза ДИНФ, мг/кг	Количество клеток с микроядрами, %		Количество полиморфно-ядерных клеток, %		Количество клеток с признаками гибели, %	
	1-3 типа	4 типа	молодые формы	сегментоядерные	некроз	апоптоз
контроль	0,33±0,22	0,17±0,17	4,58±0,83	2,42±1,01	1,17±0,59	0,42±0,22
100	0,17±0,11	1,82±0,63*	6,89±1,08	7,64±2,02*	3,98±1,01	0,33±0,33
1000	0,38±0,20	0,33±0,28	7,24±1,47	4,67±1,03	7,14±1,21*	–
10000	0,25±0,12	1,08±0,42*	6,00±1,00	4,75±0,95	5,92±0,95*	0,50±0,24

Примечание: \* – различия статистически достоверны,  $p < 0,05$ .

шение количества клеток с признаками гибели по пути некроза, при этом не наблюдается усиления пролиферативной активности и увеличения количества микроядер. Максимальная испытанная доза 10000 мг/кг химического соединения характеризуется как увеличением количества клеток с признаками некроза, так и увеличением клеток с микроядрами. Т.е. в целом, ДИНФ оказывает влияние на процессы клеточной дифференцировки, обладает ДНК-повреждающим действием и цитотоксическими свойствами, что может являться одним из возможных механизмов его эмбриотоксического (тератогенного) действия.

### Заключение

Как показали результаты экспериментов, ДИНФ способен инициировать выраженные тератогенные эффекты у крыс при внутрижелудочном введении самкам на протяжении периода беременности, такие как микрофтальмия, анэнцефалия, гидроцефалия, акрония, микрогнатия, гипоплазия легкого, отсутствие межжелудочковой перегородки, эвентрация кишечника и/или печени. Максимально испытанный уровень воздействия 10000 мг/кг фталата характеризуется увеличением общей постимплантационной и эмбриональной смертности, наличием множественных (сочетанных) пороков развития эмбрионов. При этом постнатальное развитие потомства характеризуется нарушением функции эндокринной системы: щитовидной и половых желез, приводящим к развитию первичной тестикулярной недостаточности и тиреотоксикозу. В эксперименте установлена максимально недействующая доза 10 мг/кг ДИНФ, при которой признаков тератогенного и эмбриотропного действия не выявлено.

### References

1. Dinerman AA. The role of environmental pollutants in embryonic development: nauch izd. Moscow, RF; 1980. 192 p. (In Russ.)
2. Dyban AP, Baranov VS, Akimova IM. Basic methodological approaches to test the teratogenic activity of chemical substances. Arkh Anatomii Gistologii Embriologii. 1970;59(1):89-100. (In Russ.)
3. OECD Guidelines for Testing of Chemicals [Internet]: Mammalian bone marrow chromosome aberration test: 475 Adopted 21st July 1997 [cited 2018 Jul 17].

Важнейшими элементами механизма эмбриотоксического действия ДИНФ являются нарушения процессов клеточной дифференцировки, ДНК-повреждающее действие и цитотоксические свойства фталата, которые приводили к образованию полиплоидных клеток в селезенке при однократном внутрибрюшинном воздействии фталата в опытах на белых мышах, и к накоплению лейкоцитов периферической крови с нарушениями генетического аппарата и дифференцировки (накопление сегментоядерных клеток, микроядер, клеток с признаками некроза) при субхроническом внутрижелудочном введении самцам белых крыс.

### Литература

1. Динерман, А. А. Роль загрязнителей окружающей среды в нарушении эмбрионального развития : науч. изд. / А. А. Динерман. – М., 1980. – 192 с.
2. Дыбан, А. П. Основные методические подходы к тестированию тератогенной активности химических веществ / А. П. Дыбан, В. С. Баранов, И. М. Акимова // Арх. анатомии, гистологии и эмбриологии. – 1970. – Т. 59, № 10. – С. 89–100.
3. OECD Guidelines for Testing of Chemicals [Electronic resource] : Mammalian bone marrow chromosome aberration test : 475 Adopted 21st July 1997. – Mode of access: <https://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/1948450.pdf>. – Date of access: 17.07.2018.
4. Guide for the care and use of laboratory animals / Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, Institute for Laboratory Animal Research, Division on Earth and Life Studies. – 8th ed. – Washington, D.C. : The National academies press, 1996.
5. Камышников, В. С. Лабораторная диагностика внутренних и хирургических болезней : учеб. пособие для слушателей системы дополн. образования взрослых по мед. специальностям / В. С. Камышников. – Минск : Адукацыя і выхаванне, 2012. – 584 с.

Поступила 05.06.2018 г.

Принята в печать 06.08.2018 г.

Available from: <https://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/1948450.pdf>.

4. Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, Institute for Laboratory Animal Research, Division on Earth and Life Studies. Guide for the care and use of laboratory animals. 8th ed. Washington, D.C.: The National academies press; 1996.
5. Kamyshnikov VS. Laboratory diagnostics of internal and surgical diseases: ucheb posobie dlia slushatelei sistemy dopoln obrazovaniia vzroslykh po med spetsial'nostiam. Minsk, RB: Adukatsiya i vykhavanne; 2012. 584 p. (In Russ.)

Submitted 05.06.2018

Accepted 06.08.2018

**Сведения об авторах:**

Грынчак В.А. – аспирант, младший научный сотрудник лаборатории профилактической и экологической токсикологии, Научно-практический центр гигиены;

Сычик С.И. – к.м.н, доцент, директор Научно-практического центра гигиены;

Власенко Е.К. – к.б.н., научный сотрудник лаборатории профилактической и экологической токсикологии, Научно-практический центр гигиены;

Ильюкова И.И. – к.м.н., заведующая лабораторией профилактической и экологической токсикологии, Научно-практический центр гигиены;

Афонин В.Ю. – к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории промышленной токсикологии, Научно-практический центр гигиены.

**Information about authors:**

*Grynchak V.A. – postgraduate, associate research officer of the Preventive & Ecological Toxicology Laboratory, Scientific-Practical Centre of Hygiene;*

*Sychik S.I. – Candidate of Medical Sciences, associate professor; director of the Republican Unitary Enterprise, Scientific-Practical Centre of Hygiene;*

*Vlasenko E.K. – Candidate of Biological Sciences, research officer of the Preventive & Ecological Toxicology Laboratory, Scientific-Practical Centre of Hygiene;*

*Il'yukova I.I. – Candidate of Medical Sciences, head of the Preventive & Ecological Toxicology Laboratory, Scientific-Practical Centre of Hygiene;*

*Afonin V.Yu. – Candidate of Biological Sciences, leading research officer of the Industrial Toxicology Laboratory, Scientific-Practical Centre of Hygiene.*

**Адрес для корреспонденции:** Республика Беларусь, 220012, г. Минск, ул. Академическая, 8, Научно-практический центр гигиены, лаборатории профилактической и экологической токсикологии. E-mail: grinchakva@gmail.com – Грынчак Виталий Александрович.

**Correspondence address:** Republic of Belarus, 220012, Minsk, 8 Akademicheskaya str., Scientific-Practical Centre of Hygiene, Preventive & Ecological Toxicology Laboratory. E-mail: grinchakva@gmail.com – Vitaly A. Grynchak.