

Труды Института токсикологии, посвященные 75-летию со дня основания // Под редакцией профессора С.П. Нечипоренко. СПб.: ЭЛБИ-СПб, — 2010. — 374 с.

**ISBN 978-5-93979-255-4**

Настоящее издание представляет собой сборник научных трудов сотрудников Института токсикологии ФМБА России, посвященный 75-летию со дня основания института.

В сборнике нашли отражение основные результаты научно-исследовательской деятельности института последнего десятилетия. Наряду с традиционными для института научными направлениями исследований по разработке средств медикаментозной защиты от отравлений высокотоксичными химическими веществами, в сборник вошли работы и по относительно новым исследованиям, связанным с изучением токсического действия неблагоприятных факторов окружающей среды и направленным на медицинское обеспечение химической безопасности населения России. Этим объясняется разнообразие научной тематики представленных статей, многие из которых выполнены на стыке научных специальностей — экспериментальной и клинической токсикологии, фармакологии, аналитической химии, экстремальной медицины, физиологии и биохимии.

ISBN 978-5-93979-255-4

© Коллектив авторов, 2010  
© ЭЛБИ-СПб, 2010

## МЕТОДОЛОГИЯ ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЙ ОЦЕНКИ ЕЗОПАСНОСТИ СЛАБОГРАДУСНОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ПРОДУКЦИИ

*Шевчук М.К., Петров А.Н., Георгианова Е.К., Кучер Е.О.*

В структуре потребляемых напитков в настоящее время одно из первых мест (по количеству выпитого в перерасчете на чистый этанол) занимают слабоалкогольные напитки (САН) [1]. Эти САН содержат 5–9% алкоголя и различные, чаще синтетические добавки, формирующие цвет, запах, вкус напитка. В качестве добавок часто используются витаминные, энергетические или другие компоненты (красители, ароматизаторы, биологически активные добавки, подсластители и т.д.), которые, не обладая собственной биологической активностью, могут модифицировать эффекты этанола, изменять его фармакодинамику и фармакокинетику [2, 3]. Наличие в составе газированных САН двуокиси углерода, а также сопутствующая их потреблению нагрузка жидкостью, могут влиять на фармакокинетику алкоголя, тяжесть алкогольной интоксикации и постинтоксикационного состояния [4].

Наибольший интерес представляют слабоградусные энергетические напитки, рынок которых стал формироваться в конце 1990-х годов и в настоящее время наиболее активно функционирует в Москве и Санкт-Петербурге. Особенности этих напитков является большой объем их потребления по сравнению с крепкими напитками, обусловленный привычкой использования САН для утоления жажды, большая продолжительность их потребления и возрастной состав основных потребителей САН. Основной целевой группой предложения этих напитков являются мужчины в возрасте 17–24 лет, спортсмены, автомобилисты: они пользуются большой популярностью у молодежи на дискотеках, в ночных клубах и барах, где употребляются, как правило, вместе с крепким алкоголем.

Качественный состав алкогольных напитков нормируется соответствующими ГОСТами. Для водок — это ГОСТ Р 51355-99 [5], для вин — это ГОСТ Р 52404-2005 [6], ГОСТ 28616-90 [7], ГОСТ Р 51158-98 [8], для слабоградусных алкогольных напитков ГОСТ Р 52845-2007 [9]. В соответствии с последним предъявляются требования к внешнему виду САН, лимитируется процентное содержание этилового спирта, двуокиси углерода, сахаров и количество кофеина. Однако в состав рецептур многих алкогольных напитков (АН) могут входить не нормируемые ГОСТами компоненты, об-

...обладающие собственной биологической активностью или способные влиять на токсические свойства этанола. Это определяет необходимость проведения оценки токсикологической безопасности АН.

В настоящее время токсикологическая оценка безопасности для человека алкогольной продукции производится согласно методическим рекомендациям (МР), утвержденным Госсанэпиднадзором [10]. Эти рекомендации разработаны для токсикологической оценки крепких алкогольных напитков и, как показали исследования, не могут быть применимы для оценки слабоградусной продукции, особенно в части, касающейся оценки острого токсического действия из-за низкой градусности исследуемых напитков и в этой связи невозможностью регистрации четкого эффекта (детальности), обозначенного в вышеупомянутых МР. Даже введение больших объемов исследуемых САН (25–35 мл) на протяжении 6 часов с получасовыми интервалами зачастую не вызывает летальности экспериментальных животных. Неприемлемо также для экспресс-оценки летального действия использование тестирования на бычьих сперматозоидах, так как в соответствии с нормативной документацией [11] этот метод рекомендуется только для спиртов и водок.

Предлагаемый подход к токсикологической оценке слабоградусных алкогольных напитков (САН) основан на сравнении их токсического действия с аналогичными эффектами этилового спирта той же градусности, на котором они изготовлены, и предназначен для выявления и устранения с рынка алкогольной продукции разновидностей САН, оказывающих неблагоприятное воздействие на здоровье человека.

- Объектами, подлежащими токсикологическому контролю, являются:
- новые рецептуры САН, изготовленные на основе этилового спирта с добавлением красителей, ароматизаторов, витаминов, экстрактов растительного сырья и других биологически активных компонентов на этапе их согласования и внедрения в производство;
  - любые САН при решении специальных токсикологических задач экспертного или арбитражного характера;
  - крупные партии САН, поступающие по импорту на этапе заключения контракта;
  - рецептуры САН, созданные ранее отечественными производителями, в состав которых входят красители, ароматизаторы, витамины, экстракты растительного сырья и другие биологически активные компоненты при наличии оснований предполагать повышенную токсичность.

Предлагаемая программа углубленного исследования безопасности САН должна способствовать унификации и оптимизации методических подходов, используемых при токсикологической оценке их безопасности.

Исходя из того, что токсическое действие этанола и созданных на его основе САН затрагивает важнейшие функции всего организма, учитывая сложность и длительность оценки различных эффектов алкоголя, принимая во внимание, что САН могут приниматься систематически в течение продолжительного времени, следует подходить к оценке их безопасности так, как принято подходить к оценке безопасности лекарственных препаратов или пищевых продуктов.

Предлагаемая комплексная оценка токсикологической безопасности САН основана на сравнении эффектов САН и эталонного раствора спирта, на котором они изготовлены, при однократном и длительном введении.

Изучение острого токсического действия позволяет получить представления о выраженности токсических эффектов в результате однократного воздействия САН. С помощью стандартных методов оценивается наркотическое действие, поведение, симптомы алкогольной интоксикации (тест «крестообразный лабиринт») и ряд вегетативных паттернов.

Оценка подострого токсического действия позволяет выявить наличие и выраженность патологических сдвигов в условиях, моделирующих многократное потребление САН. В опытах на теплокровных животных в условиях многократного внутрижелудочного введения САН в дозе 1,9 г/кг в течение 1,5 месяца (45 дней) с помощью стандартных методов производится оценка алкогольного поражения головного мозга, сердечно-сосудистой системы, печени, почек, функций памяти.

Токсикологическая оценка безопасности САН основана на сравнении показателей острого и подострого действия исследуемого образца с аналогичными показателями этилового спирта, на основе которого изготовлен напиток или эталонного раствора этилового спирта той же крепости.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проводятся на крысах-самцах и мышах-самцах (поведение в «крестообразном лабиринте») в условиях депривации пищи в течение 24 часов. С целью получения информативных и сопоставимых результатов, оценка токсических эффектов САН на теплокровных животных осуществляется с соблюдением требований GLP (Good laboratory practice), применяемых при изучении безопасности лекарственных препаратов и в соответствии с правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных, утвержденными Минздравом РФ [12].

Обработка результатов проводится по методу Стьюдента. Достоверными считаются результаты при  $p < 0,05$ .

## Оценка острого токсического действия

Оценка летального действия проводится при однократном введении исследуемых растворов и наблюдении над животными в течение 5 суток. В силу низкой градусности исследуемых напитков и зачастую невозможности достижения летального эффекта предлагается введение по 3,5 мл растворов каждые 30 минут в течение 6 часов [10] согласно методическим указаниям по оценке острого токсического действия при исследовании безопасности лекарственных препаратов.

Регистрируемые показатели:

- суммарный объем введенных растворов за 6 часов,
- летальность (если таковая будет иметь место).

При наличии летальности расчет токсикометрических параметров ( $LD_{16}$ ,  $LD_{50}$ ,  $LD_{84}$ ) проводится с помощью пробит-анализа по методу Литфилда-Вилкоксона или специализированных компьютерных программ. При отсутствии летальности оценивается максимально вводимый объем исследуемых (V) напитков и рассчитывается максимально введенная доза (D) по формуле

$$D(\text{г/кг}) = \frac{V(\text{мл}) \times C\% \times 10 \times 0,789}{M(\text{г})}$$

где M — масса тела животного в граммах.

## Оценка выраженности и динамики наркотического действия

Наркотический эффект оценивается в баллах визуально по специальной шкале [10] через 1,5; 2,5, 3,5 и 24 часа после введения (2,5 часа максимальной длительности наркотического действия САН с концентрацией этанола 5–9%).

В соответствии со шкалой оценки:

- 1 балл — незначительное, едва заметное снижение тонуса мышц спины;
- 2 балла — заметное снижение тонуса мышц спины, умеренное нарушение координации (отчетливое заваливание на поворотах и появление признаков «гусиной походки»);
- 3 балла — выраженное нарушение координации (шатающаяся и выраженная «гусиная походка»);
- 4 балла — распластанность при опускании животного на пол, выраженная положительная проба на провисание, ограничение способности к передвижению (при перемещении касание животом поверхности и/или волочение задней части тела);
- 5 баллов — глубокий наркоз (стойкое боковое положение).

Регистрируемые показатели:

- максимальная выраженность наркотического действия,
- продолжительность наркотического действия,
- интегральная выраженность наркотического действия (сумма баллов за исследуемый интервал времени).

*При исследовании поведенческих параметров регистрируется:*

- поведение в «крестообразном лабиринте» через 60 минут после последнего введения (мыши) [13];
- в качестве дополнительных тестов могут быть использованы методы оценки УРПИ и время удержания на «вращающемся стержне» (крысы).

Приспособление для регистрации параметров поведения мышей в тесте «крестообразный лабиринт» состоит из четырех одинаковых тупиковых отсеков, соединенных между собой через такую же пятую центральную камеру с отверстиями (7×7см) в стенке для входа со стороны центральной камеры. Размер отсеков 15×15×15см. На полу лабиринта проведены маркирующие линии, разъединяющие поле тупиковых и центрального отсеков. В начале тестирования мышь помещается в центральную камеру. Затем, в течение 4 минут наблюдают последовательность ее перемещений при исследовании животным помещений «крестообразного лабиринта». Заход в тупик считается состоявшимся, если все лапы перенесены через линию, отделяющую поле отсека от центральной камеры. Регистрируются и оцениваются следующие параметры поведения мышей:

- латентный период начала исследования лабиринта (с) — показатель скорости принятия решения;
- количество посещенных тупиков за 4 минуты — показатель уровня поисковой активности;
- время посещения 13 тупиков (с) — коррелирует исследовательской активности в тесте «открытого поля»;
- время полного обхода лабиринта (с) — отражает способность к пространственной ориентации, а также рассматривается как одна из форм элементарной рассудочной деятельности у животных (чем эффективнее пространственная ориентация, тем за меньшее число посещений отсеков осуществляется первый полный обход всех отсеков лабиринта);
- количество вертикальных стоек — показатель уровня исследовательской активности;
- количество возвратов в тупик, посещенный при предыдущем визите — показатель ошибок краткосрочной памяти;

поочередное посещение двух из четырех тупиков интерпретируется как поведенческая стереотипия;

— количество левых и правых поворотов при переходе из тупика в тупик через центральный отсек лабиринта, отражает степень асимметрии локомоции;

— количество диаметральных переходов из тупика в тупик через центральный отсек лабиринта — показатель степени нарушения навигационного научения и пространственной памяти.

Перечисленные параметры поведения позволяют провести комплексную оценку действия алкоголя и исследованных САН на различные стороны поведения животных, их память, выявить некоторые патологические формы поведения.

Результаты исследования в процессе наблюдения вносятся в специальные регистрационные карты, индивидуальные для каждого животного. В этой карте посекундно в течение 4 минут отмечаются вертикальные стойки и перемещения животного по отсекам лабиринта, которым условно присвоены номера 1, 2, 3, 4. Центральный отсек не пронумерован, поскольку перемещение животного из отсека в отсек происходит обязательно через центральный.

*При оценке влияния на вегетативные показатели через 1 час после последнего введения регистрируются:*

- показатели электрокардиограммы (ЭКГ);
- систолического артериального давления (АД);
- частота дыхания;
- температура тела;
- величина суммационно — порогового импульса [14].

Систолическое артериальное давление измеряют бескровным методом на хвосте животных с помощью регистратора артериального давления.

Для записи ЭКГ и ЧД и СПП можно использовать полиграф RM-6000 «Nihon Kohden» (Япония) или аналогичные устройства других фирм. Для регистрации ЭКГ и ЧД животных помещают в специальные клетки-пеналы. ЭКГ записывают при помощи введенных подкожно игольчатых электродов, изготовленных из нержавеющей стали, для регистрации ЧД применяются термопары, вмонтированные в клетки пеналы.

Для регистрации СПП электроды электростимулятора обертывают марлей, смоченной физиологическим раствором. Свободные от шерсти поверхности задних конечностей животного помещают на электроды. СПП определяют путем равномерного увеличения напряжения со скоростью

1–2 В/с до отдергивания лапы. Величина напряжения тока в вольтах регистрируется в протоколе.

С помощью термодатчика производят измерение температуры в прямой кишке.

Общая продолжительность проведения исследования острого токсического действия, включая обработку экспериментальных данных и составление отчетной документации — 14 дней. Необходимое количество животных (крысы, мыши) для оценки острого токсического действия не менее 80.

### Оценка подострого токсического действия

При оценке подострого токсического действия проводится еженедельная регистрация веса животного, после окончания введения проводится оценка алкогольного поражения сердца, печени, почек.

Оценка алкогольного поражения мозга осуществляется посредством исследования функций краткосрочной и долговременной памяти методом условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ) через 2 и 24 часа после последнего введения исследуемых САН, исследовании гистологических срезов мозга (обзорные методы окраски) и регистрации относительной массы мозга.

Исследования проводят на предварительно отобранных животных, время пребывания которых в светлой камере, не превышало 40 секунд. [15]. Отбор животных для испытания осуществляют в специальной камере, состоящей из темного и светлого отсеков. Животное помещают в светлый отсек камеры. Естественный норковый рефлекс побуждает животное к переходу в темный отсек. Продолжительность времени от момента помещения животного в камеру до перехода его в темный отсек (секунды) составляет латентный период перехода. В течение 120 секунд регистрируют время пребывания животного в светлой и темной камерах. Во время обучения в темном отсеке животному наносят раздражение электрическим током, что в дальнейшем побуждает животное избегать этого отсека.

Тестирование памяти проводят через 2 и 24 часа после обучения. Для этого животное помещали в светлый отсек камеры и в течение 120 секунд регистрировали время пребывания животных в темном и светлом отсеках камеры, продолжительность латентного периода перехода и количество животных, не зашедших в темный отсек (обученные). Уменьшение латентного периода перехода, увеличение длительности пребывания в темной камере, само нахождение в темном отсеке свидетельствует о нарушении памяти и, следовательно, нарушении функционирования ЦНС.

Учитывая специфику потребления САН, которое зачастую сопровождается усиленной физической нагрузкой, целесообразно оценивать влия-



...на состояние сердечной деятельности после моделирования этого состояния, например бега на «бегущей дорожке». Регистрация показателей осуществляется через 24 часа после последнего введения исследуемых САН и через 15 минут после бега. Регистрируются следующие показатели: показатели ЭКГ, АД, относительная масса сердца, проводится морфологическое исследование сердца (обзорные методы окраски).

При оценке алкогольного поражения печени регистрируются биохимические показатели сыворотки крови (активность аланин- и аспартатаминотрансфераз, щелочной фосфатазы, гамма-глутамилтранспептидазы, содержание билирубина, холестерина), а также проводится морфологическое исследование печени (обзорные методы окраски) и регистрируется относительная масса печени [16–20].

При оценке алкогольного поражения почек регистрируется относительная масса почек и проводится морфологическое исследование ткани почек (обзорные методы окраски). В качестве вспомогательных показателей можно оценивать спонтанный диурез и рН мочи.

Общая продолжительность исследования подострого действия, включая обработку экспериментального материала и составление отчетной документации — 60 дней. Необходимое количество животных (крыс) для оценки — не менее 20.

### Оценка полученных результатов

В ходе комплексной токсикологической оценки безопасности САН осуществляется сопоставление полученных показателей исследуемого образца САН с аналогичными показателями соответствующих концентраций эталонных образцов этилового спирта или этилового спирта, на котором изготовлен данный образец. Основные полученные данные, кроме токсикометрических параметров, подвергаются статистической обработке с использованием *t*-критерия Стьюдента. В оценку токсичности испытуемого САН не включаются данные санитарно-химических исследований, показатели которых оцениваются отдельно на предмет соответствия ГОСТам, техническим регламентам или техническим условиям. Достоверные по сравнению с контрольным образцом негативные изменения, вызванные исследуемым образцом, суммируются. При этом негативные эффекты, достоверные при  $p < 0,05$  оцениваются в 1 балл, достоверные при  $p < 0,01$  — в 2 балла, а достоверные при  $p < 0,001$  — в 3 балла.

Оценка подострого токсического действия не проводится, если при исследовании острых токсических эффектов на теплокровных животных исследуемая спиртосодержащая жидкость оказывала более выраженное

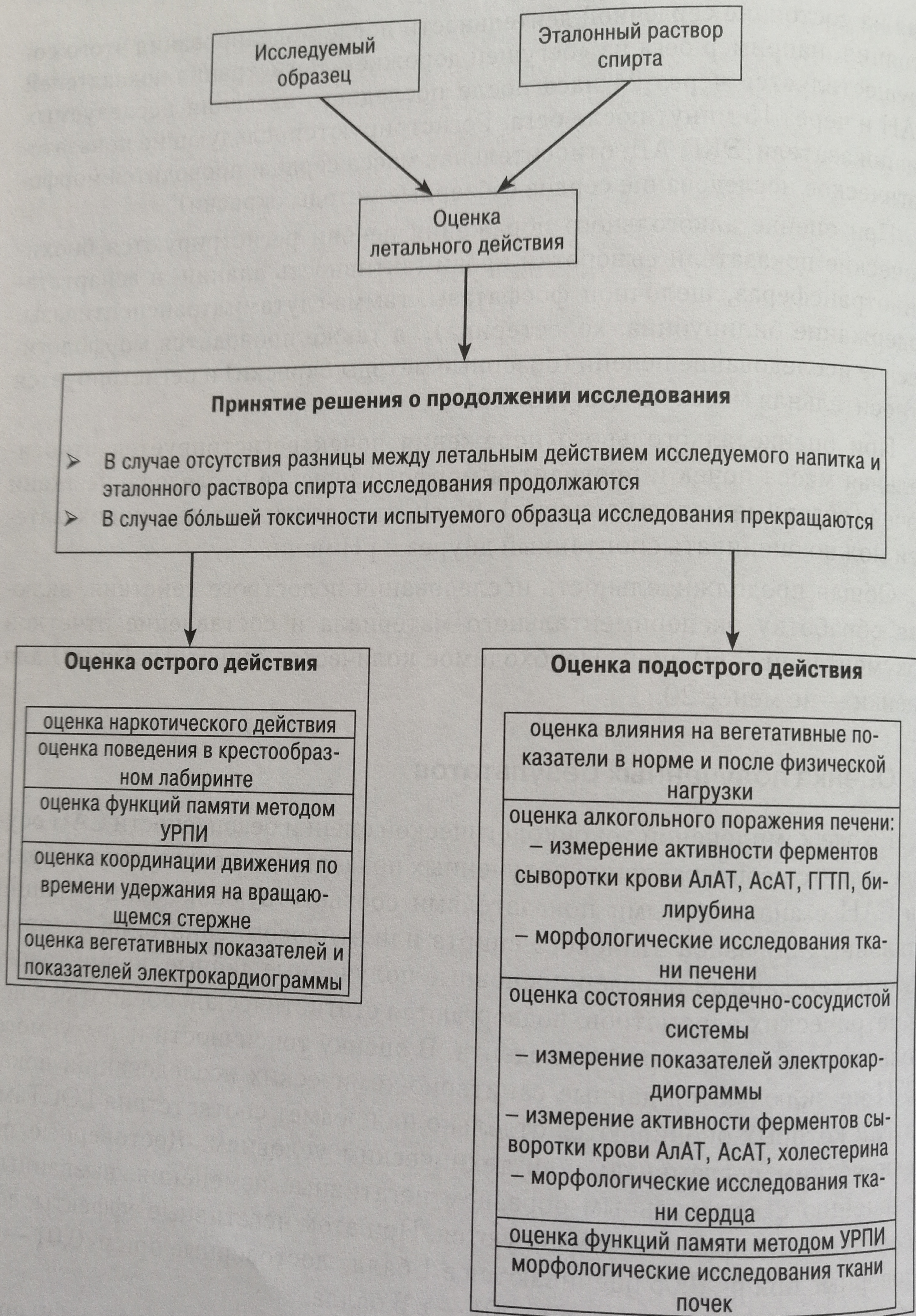


Схема 1. Схема токсикологической оценки слабоградусных алкогольных напитков

токсическое действие по сравнению с эталонным раствором этилового спирта, по крайней мере, по трем тестам (схема 1).

Критериями токсического действия испытуемых САН являются:

- количество тестов, по которым обнаружены статистически значимые различия при оценке острого и подострого действия исследуемой спиртосодержащей жидкости и эталонного раствора спирта, на котором приготовлен исследуемый образец;
- сумма баллов, полученных при исследовании испытуемого образца, сравниваемая с суммой баллов, полученных при аналогичном исследовании эталонного раствора спирта, на котором изготовлен САН.

На основании совокупности полученных данных составляется отчет о результатах исследования с заключением, в котором отражены сведения о том, на какие исследуемые параметры испытуемый образец оказал более выраженное по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ) токсическое действие. Делается вывод о большей или меньшей токсичности исследуемого САН по сравнению с соответствующим раствором этилового спирта.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Фридман К.Б. Аспекты алкоголизации населения Санкт-Петербурга по материалам социально-гигиенического мониторинга / Фридман К.Б., Лукьянова Ю.А., Ларина О.О. // Медицинская профилактика наркологических заболеваний: сб. материалы научно-практической конференции. — СПб, 2003. — С.12–14.
2. Шевчук М.К. Особенности взаимодействия алкоголя и лекарственных средств / Шевчук М.К., Петров А.Н., Георгианова Е.К. и др. // Алкогольная болезнь. — 1999. — №10. — С.1–8.
3. Основы клинической фармакологии и рациональной фармакотерапии. — М.: Бионика, 2002. — С. 204–298.
4. Нужный В.П. Сравнительное исследование психофизиологических эффектов водки, пива и слабоалкогольного газированного напитка / Нужный В.П., Пометов Ю.Д., Ковалева Е.В. и др. // Вопросы наркологии. — 2003. — Т. 2. — С. 22–35.
5. ГОСТ Р 51355-99. Водка и водки особые. Общие технические условия. М.: Издательство стандартов, 2002.
6. ГОСТ Р 52404-2005. Вина специальные и виноматериалы специальные Общие технические условия. — М.: Стандартинформ, 2006.
7. ГОСТ 28616-90. Вина плодовые. Общие технические условия». — М, 1990.
8. ГОСТ Р 51158-98. «Вина игристые. Общие технические условия. — М.: Издательство стандартов, 1998.
9. ГОСТ Р 52700- 2006. Напитки слабоалкогольные. Общие технические условия. М.: Стандартинформ, 2007.

10. Методические рекомендации «Комплексная токсикологическая оценка безопасности рецептур алкогольных напитков». Санкт-Петербург. — 2002, № 11. — № 5/220-09. — 19 с.
11. Экспресс-метод оценки токсичности спиртов и водок с использованием в качестве тест-объекта спермы крупного рогатого скота. Методические рекомендации МР № ФУ/1504.
12. Правила лабораторной практики в Российской Федерации. Приказ МЗ РФ № 267 от 19.06.2003.
13. Методические указания по изучению препаратов для лечения алкоголизма // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. — М.: Медицина, 2005. — С. 342.
14. Рекомендации для предварительной оценки токсичности химических веществ ускоренным методом. Методическое письмо Л. — 1971.
15. Методические указания по изучению ноотропной активности фармакологических веществ // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. — М.: Медицина, 2005. — С. 308–320.
16. *Reitman S.* Colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases / *Reitman S., Frankel S.* // *Amer. J. Clin. Patol.* — 1957. — V. 28. — P. 56–63.
17. *Szasz G.A.* A kinetic photometric method for serum  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase / *Szasz G.A.* — *Clin. Chem.* — 1969. — V. 15. — P. 124.
18. *Bessey O.A.* A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum / *Bessey O.A., Lowry O.N., Brock M.J.* // *J. Biol. Chem.* — 1946. — V. 164. — P. 32.
19. *Jendrassik L.* Vereinfachte photometrische Methoden zur Bestimmung des Blutbilirubins / *Jendrassik L., Grof P.* // *Biochem. Z.* — 1938. — V. 297. — P. 81.
20. *Меньшиков В.В.* Лабораторные методы исследования в клинике / *Меньшиков В.В.* — Справочник. — М., 1987. — 365 с.