

Масальцев Г.В.¹, Хамидулина Х.Х.^{2,3}, Тарасова Е.В.², Замкова И.В.²

Изучение скрининговым методом репродуктивной/эмбриональной токсичности при многократном воздействии 2-этилгексановой кислоты

¹ФБУН «Федеральный научный центр гигиены имени Ф.Ф. Эрисмана» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 141014, Мытищи, Россия;

²Российский регистр потенциально опасных химических и биологических веществ – филиал ФБУН «Федеральный научный центр гигиены имени Ф.Ф. Эрисмана» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 121087, Москва, Россия;

³ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 125993, Москва, Россия

РЕЗЮМЕ

Введение. В Российской Федерации химические вещества, внедряемые в хозяйственную деятельность, подлежат обязательной токсикологической оценке и гигиеническому регламентированию. Для обоснования гигиенического норматива 2-этилгексановой кислоты, производство которой планируется на территории нашей страны, требовалось дополнительное изучение воздействия вещества на репродуктивную функцию.

Цель исследования – совместное изучение общетоксического действия 2-этилгексановой кислоты с репродуктивной/эмбриональной токсичностью при повторном воздействии, установление значений NOAEL по данным видам воздействия.

Материалы и методы. Исследования выполнены в соответствии с требованиями руководства ОЭСР 422 «Совместное исследование токсичности при многократном воздействии с репродуктивной/эмбриональной токсичностью (скрининговый метод)».

Результаты. Во время эксперимента не наблюдали гибели животных или проявления клинических симптомов токсического действия 2-этилгексановой кислоты при внутрижелудочном пути поступления в дозах 250; 500 и 1000 мг/кг массы тела (м. т.). Оценка поведенческих реакций по методу открытого поля показала отсутствие отличий у животных в опытных группах и контроле. При гистологическом исследовании установлено, что кислота в дозах 500 и 1000 мг/кг м. т. вызвала значимые изменения в мочевом пузыре у самцов и самок крыс (увеличение склероза в подслизистой основе), лёгких (увеличение доли эмфизематозно изменённой паренхимы), надпочечниках (увеличение альтерации клеток и лимфатических включений), щитовидной железе (увеличение локусов интерфолликулярной ткани). Установлено, что общая масса потомства в опытных группах, получавших 500 и 1000 мг/кг м. т. кислоты, была статистически дозозависимо снижена на 4-й и 13-й дни после родов по сравнению с контролем.

Ограничения исследования. Исследование не имело ограничений.

Заключение. Не установлено влияния 2-этилгексановой кислоты на репродуктивную функцию экспериментальных животных. Воздействие на развивающееся потомство (снижение общей массы) отмечено на уровне общетоксических доз и не является специфическим. Установлены значения NOAEL для родительских особей по общетоксическому действию на уровне 250 мг/кг м. т., по репротоксическому эффекту на уровне > 1000 мг/кг м. т.

Ключевые слова: 2-этилгексановая кислота; репродуктивная/эмбриональная токсичность; скрининговый метод; метод ОЭСР 422

Соблюдение этических стандартов. Исследование было одобрено биоэтической комиссией ФБУН «ФНЦГ им. Ф.Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора (протокол № 01/22 от 27.10.2022 г.).

Для цитирования: Масальцев Г.В., Хамидулина Х.Х., Тарасова Е.В., Замкова И.В. Изучение скрининговым методом репродуктивной/эмбриональной токсичности при многократном воздействии 2-этилгексановой кислоты. *Гигиена и санитария*. 2024; 103(9): 1037–1043. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2024-103-9-1037-1043> <https://elibrary.ru/bqjker>

Для корреспонденции: Хамидулина Халида Хизбулаевна, e-mail: director@rosreg.info

Участие авторов: Хамидулина Х.Х. – концепция и дизайн исследования, редактирование, утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи; Тарасова Е.В. – концепция и дизайн исследования, написание текста, редактирование; Замкова И.В. – написание и редактирование текста; Масальцев Г.В. – сбор и обработка материала, написание и редактирование текста.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов в связи с публикацией данной статьи.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке АО «Сибур-Химпром».

Поступила: 29.05.2024 / Принята к печати: 23.09.2024 / Опубликована: 16.10.2024.

Gleb V. Masaltsev¹, Khalidya Kh. Khamidulina^{2,3}, Elena V. Tarasova², Irina V. Zamkova²

Study of combined multiple exposure and reproductive / developmental toxicity of 2-ethylhexanoic acid by screening method

¹Federal Scientific Center of Hygiene named after F.F. Erisman of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Mytishchi, 141014, Moscow region, Russian Federation;

²Russian Register of Potentially Hazardous Chemical and Biological Substances – Branch of the Federal Scientific Center of Hygiene named after F.F. Erisman of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Moscow, 121087, Russian Federation;

³Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, 125993, Russian Federation

ABSTRACT

Introduction. According to the normative and methodological documents of the Russian Federation, chemicals introduced into economic activities are subject to mandatory toxicological assessment and hygienic regulation. To substantiate the value of the hygienic standard of 2-ethylhexanoic acid, the production of which is planned in the country, additional test on its reproductive toxicity was required.

The aim of the research was to determine the no-observed adverse effect levels of the 2-ethylhexanoic acid for maternal and reproductive toxicities in combined multiple exposure and the reproduction/developmental toxicity screening test (OECD 422).

Materials and methods. The study was performed in accordance with the requirements of the OECD Test Guideline 422 «Combined repeated dose toxicity study with the reproduction/developmental toxicity screening test».

Results. During the experiment no animal deaths or clinical symptoms of the toxic effect of 2-ethylhexanoic acid were observed at all tested doses (250, 500 and 1000 mg/kg b.w.). The assessment of behavioural responses using the open field method showed no differences in animals from experimental and control group. Histological examination indicated the acid at doses of 500 and 1000 mg/kg b.w. to cause significant changes in bladder (increased sclerosis in the submucosa), lungs (increased proportion of emphysematous altered parenchyma), adrenal gland (increased cell alterations and lipomatous inclusions), thyroid gland (increased loci of interfollicular tissue) in males and females' rats. The total weight of offspring in the experimental groups was found to be statistically dose-dependent reduced on days 4 and 13 after birth compared with the control.

Limitations. The study had no limitations.

Conclusion. 2-Ethylhexanoic acid has no effect on the reproductive function in experimental animals. Developmental toxicity, expressed in a decrease in the total weight of offspring, was observed at the level of general toxic effects and is not specific. NOAELs were established at the level of 250 mg/kg b.w. for general toxic effect, > 1000 mg/kg b.w. for reprotoxic effect.

Keywords: 2-ethylhexanoic acid; reproductive / developmental toxicity; screening; OECD test guideline 422

Compliance with ethical standards. The study was approved by the bioethical commission of the Federal Scientific Center of Hygiene named after F.F. Erisman.

For citation: Masaltsev G.V., Khamidulina Kh.Kh., Tarasova E.V., Zamkova I.V. Study of combined multiple exposure and reproductive / developmental toxicity of 2-ethylhexanoic acid by screening method. *Gigiena i Sanitariya / Hygiene and Sanitation, Russian journal*. 2024; 103(9): 1037–1043. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2024-103-9-1037-1043> <https://elibrary.ru/bqjker> (In Russ.)

For correspondence: Khalidya Kh. Khamidulina, e-mail: director@rosreg.info

Contribution: Khamidulina Kh.Kh. — concept and design of the study, editing, approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article; Tarasova E.V. — concept and design of the study, collection and processing of materials, text writing, editing; Zamkova I.V. — text writing, editing; Masaltsev G.V. — experimental work, collection and processing of materials, writing text.

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

Acknowledgement. The study was financially supported by Sibur-Khimprom JSC.

Received: May 29, 2024 / Accepted: September 23, 2024 / Published: October 16, 2024

Введение

В Российской Федерации химические вещества, внедряемые в хозяйственную деятельность, подлежат обязательной токсикологической оценке и гигиеническому регламентированию. Если вещество относится к гомологическому ряду, представители которого имеют утверждённую величину ПДК для воздуха рабочей зоны, предельно допустимая концентрация устанавливается на основе сопоставления известных параметров токсикометрии [1].

Необходимость обоснования гигиенического норматива содержания паров и аэрозоля 2-этилгексановой кислоты в воздухе рабочей зоны возникла в связи с тем, что в нашей стране планируется производство этого вещества для нужд химической промышленности, в том числе при производстве пластика, красок, эмалей, лаков, в качестве консерванта, замедлителя коррозии, смачивающего агента, в производстве низкомолекулярных ароматических и алифатических эфиров.

Анализ литературных данных показал, что в соответствии с ГОСТ 12.1.007–76 «Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности» 2-этилгексановая кислота по параметрам острой токсичности при внутрижелудочном введении (DL_{50} 1600–3640 мг/кг, крысы; 800–1600 мг/кг, морские свинки) может быть отнесена к умеренно опасным веществам (3-й класс опасности); при кожном нанесении (DL_{50} 1134–1260 мг/кг, кролики; > 2000 мг/кг, крысы; 5670–6300 мг/кг морские свинки) — к умеренно опасным веществам (3-й класс опасности); при ингаляционном поступлении (CL_{50} , 4 ч, крысы, не достигается) — к малоопасным веществам (4-й класс опасности) [2–8].

Высокоочищенная кислота вызывает слабое раздражение кожи и слизистых оболочек глаз. Обладает слабой кумуляцией (метод Лима, $1/10DL_{50}$, внутрижелудочный путь поступления, крысы, коэффициент кумуляции $S_{cum} > 5$) [3]. Не установлено сенсibilизирующего действия в опыте на морских свинках. Мутагенный эффект не установлен в тестах *in vitro* на бактериях и клетках яичников китайского хомяка (СНО), клетках лимфомы мыши L5178Y, лимфоцитах крыс в присутствии и отсутствии системы метаболической активации и микродермном тесте *in vivo* на крысах [3, 5, 8]. Изучение канцерогенного действия не проводилось ввиду отсутствия мутагенной активности вещества [5–7]. В исследованиях на репротоксичность и при изучении воздействия на развивающееся потомство

получены противоречивые данные [3, 5, 8, 9–20]. В некоторых исследованиях на крысах продемонстрирована токсичность для развития в ответ на пероральное воздействие 2-этилгексановой кислоты [9–21]. При изучении влияния кислоты на органогенез, процессы развития плода по методу ОЭСР № 414 «Оценка токсического действия на пренатальное развитие» на крысах наблюдали дозозависимую тенденцию в частоте возникновения порока развития — расширенных боковых желудочков головного мозга со сдавливанием тканей. В эксперименте значение NOAEL для материнской токсичности определено на уровне 250 мг/кг массы тела (м. т.), значение NOAEL для токсичности для развития — на уровне 100 мг/кг м. т. [5, 8–10]. Был сделан вывод о тератогенном действии вещества [5].

Таким образом, для обоснования гигиенического норматива 2-этилгексановой кислоты в воздухе рабочей зоны требовалось дополнительное изучение воздействия вещества на репродуктивную функцию.

Цель исследования — совместное изучение общетоксического действия 2-этилгексановой кислоты с репродуктивной/эмбриональной токсичностью при многократном воздействии, установление значений NOAEL по данным видам воздействия.

Материалы и методы

Экспериментальные исследования *in vivo* были проведены в Испытательной биологической лаборатории ФБУН «ФНЦГ им. Ф.Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора в соответствии с принципами «Руководства по качеству испытательного лабораторного центра ФБУН «ФНЦГ им. Ф.Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора». Обеспечение надлежащего качества исследований при использовании оборудования регулировали соблюдением нормативных внутренних документов: стандартных операционных процедур, разработанных в соответствии с требованиями нормативно-правовых актов [22, 23]; 2-этилгексановая кислота (х. ч., содержание основного компонента > 99%) была предоставлена АО «Сибур-Химпром».

Все процедуры с животными в исследовании проводились в соответствии с общепринятыми этическими нормами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных или иных научных целей (1986 г.), и с учётом Международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных

исследованиях (1997 г.). Все работы были одобрены биоэтической комиссией ФБУН «ФНЦГ им. Ф.Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора.

При выполнении исследовательской работы метрологическое обеспечение подтверждено свидетельствами о поверке или аттестации используемого оборудования, регулярном техническом обслуживании; документами, подтверждающими поверки (контроль) и калибровки приборов; обеспечением надлежащих параметров микроклимата в помещениях.

Исследования проводили на самцах и самках конвенциональных крыс. Животные (52 самки и 40 самцов) были получены из питомника «Филиал «Андреевка» ФГБУН «Национальный центр биомедицинских технологий» ФМБА России. Животные находились в карантине в течение семи дней до начала исследования.

К началу эксперимента масса тела самок находилась в диапазоне от 236 до 297 г, масса самцов — от 259 до 328 г. Перед началом экспозиции у самок оценивали нормальность эстрального цикла с 1-го по 14-й день исследования. С 14-го дня исследования начинали вводить 2-этилгексановую кислоту трём опытным группам самцов и самок ежедневно (перорально) в дозах 250; 500 и 1000 мг/кг м. т. в объёме 2 мл на 100 г м. т. животного (носитель — дистиллированная вода). Самцы получали 2-этилгексановую кислоту до конца спаривания, самки — до окончания исследования. Животные контрольной группы получали носитель в эквивалентном объёме. В ходе эксперимента животных еженедельно взвешивали, оценивали общее состояние, внешний вид и поведение, у пяти самок и пяти самцов каждой группы оценивали реакцию на раздражители.

Через 14 дней дозирования (28-й день от начала исследования) самцов и самок ссаживали в соотношении 1 : 1 (одна самка и один самец), ежедневно проводили мониторинг появления признаков спаривания по вагинальным мазкам в период 14 дней спаривания. На 41-й день от начала исследования были изучены поведенческие реакции в открытом поле у самцов. На 42-й день исследования у самцов всех групп отбирали образцы крови для гематологического, биохимического и иммуноферментного исследований, затем умерщвляли (CO_2), проводили патологоанатомическое вскрытие, забирали образцы органов и тканей для гистологического исследования.

На 4-й день после родов (56–64-й дни от начала исследования) для каждого помёта определяли количество детёнышей, общую массу помёта, распределение детёнышей по полу в помёте, измеряли аногенитальное расстояние (в мм), умерщвляли двух детёнышей-самок для определения концентрации гормонов ТТГ и Т4 в крови. На 7-й день после рождения определяли наличие сосков у детёнышей-самцов. На 12-й день после родов у родивших самок были изучены поведенческие реакции в открытом поле, также оценивалась способность потомства удерживать соски при кормлении. На 13-й день после родов (77–85-й дни от начала исследования) у самок всех групп отбирали образцы крови для гематологического, биохимического и иммуноферментного исследований, затем умерщвляли (CO_2), проводили патологоанатомическое вскрытие, забирали образцы органов и тканей для гистологического исследования. Всех детёнышей также умерщвляли, отбирали образцы крови для определения концентрации гормонов ТТГ и Т4.

Все животные подверглись патоморфологическому исследованию. При некропсии исследовали внешнее состояние тела, внутренних поверхностей и проходов, полости черепа, брюшной и тазовой областей с находящимися в них органами и тканями, шею с органами и тканями, каркас и скелетно-мышечную систему. Дополнительно для оценки массы внутренних органов у пяти самок и пяти самцов, выбранных случайным образом из каждой группы, после вскрытия выделяли печень, почки, надпочечники, тимус, селезёнку, мозг и сердце, очищали от прилегающих тканей и взвешивали, не допуская высыхания.

Гистологическому исследованию подвергали других пять самок и самцов, выбранных случайным образом из каждой группы. У них отбирали следующие органы и ткани: все органы с макроскопическими поражениями, головной мозг, спинной мозг, глаз, желудок, тонкий и толстый кишечник, печень, почки, надпочечники, селезёнку, сердце, тимус, трахею и лёгкие, гонады, вспомогательные половые органы, влагалище, мочевого пузырь, лимфатические узлы, периферические нервы (седалищные и большеберцовые), скелетные мышцы и кости с костным мозгом (или со свежим аспирином костного мозга). Органы фиксировали в 10%-м забуференном нейтральном формалине. После фиксации материал промывали в проточной воде, кусочки размером $0,3 \times 0,5$ см подвергали дегидратации в спиртах восходящей концентрации и пропитывали парафином в автоматической системе для гистологической обработки ткани типа «Карусель», модель STP-120 (Microm, Германия); заливку в парафин производили с помощью станции для заливки блоков EC-350 I и EC-350 II (Microm, Германия). Гистологические срезы (толщиной 5–10 мкм) готовили с помощью ротационного микротомы HM-325 с системой переноса срезов (Microm, Германия). Срезы окрашивали гематоксилин-эозином по стандартной методике на автоматическом приборе Tissue-Tek DRS 2000 (Sakura, Япония) и вручную заключали под покровное стекло. Подготовленные из вышеуказанных органов микропрепараты оценивали при помощи микроскопа Meiji Techno MT5300L (Япония). Использовали морфологический, морфометрический и стереометрический анализы. Оценка показателей проводилась в процентах (как число учитываемых показателей к общему числу просчитанных) и в баллах, если учитывался показатель по альтернативному признаку (0–1 балл), либо по степени выраженности изучаемого показателя (0–3 балла). Статистически определяли среднюю арифметическую величину и её доверительные границы с уровнем достоверности 95%. Достоверными считали различия при $P < 0,05$. Тенденцией считали более чем двукратное изменение показателя.

Гематологические исследования проводили на анализаторе Abacus Vet 5 Junior, что позволило оценить 14 параметров. Биохимические и иммуноферментные исследования проводили на анализаторе ChemWell 2900. Концентрации гормонов ТТГ и Т4 определяли в сыворотке крови с помощью наборов производства АО «Вектор Бест» (Россия). Измеряли 15 биохимических показателей сыворотки крови лабораторных животных с применением готовых наборов реактивов Hospitex Diagnostics s. r. l. (Италия).

Обработку первичных данных при подготовке к статистическому анализу осуществляли в программе Microsoft Office Excel 2013. Статистический анализ результатов исследований проводили с использованием программы SPSS Statistics версии 22.0 (IBM, США) при $\alpha = 0,05$. Наличие статистических выбросов проверяли методом построения ящичных диаграмм. Сравнение между группами осуществляли при помощи непараметрического критерия Краскала — Уоллиса, а также двухсторонним тестом Даннетта t . Проверку наличия тренда в исследованиях осуществляли методом ранговых корреляций Спирмена (двухсторонний анализ) в случае выявления значимого отличия между группами [24–26].

Результаты

За время эксперимента не наблюдали гибели животных или проявления клинических симптомов токсического действия 2-этилгексановой кислоты. Оценка поведенческих реакций по методу открытого поля показала отсутствие отличий у животных в опыте и контроле. Не наблюдалось никакого влияния вещества на фертильность и репродуктивные показатели самцов и самок крыс; отсутствовало влияние на частоту живорождений и мертворождений, показатели жизнеспособности и соотношение полов потомства при воздействии всех испытанных доз (250; 500 и 1000 мг/кг м. т.).

Таблица 1 / Table 1

Показатели здоровья потомства
Indices of offspring health

Группа Group	Количество самцов в помете Number of males in the litter	Количество самок в помете Number of females in the litter	Общее количество детёнышей в помете Total number of offsprings in the litter	Масса тела детёныша на 4-й день после рождения (г)** Weight of offspring on the 4 th day after birth (g)**	Масса тела детёныша на 13-й день после родов (г)*** Weight of the offspring on the 13 th day after birth (g)***	Аногенитальное расстояние на 13-й день после рождения (мм) Anogenital distance on the 13 th day after birth (mm)	Наличие сосков у самцов на 13-й день после рождения Presence of nipples in males on the 13 th day after birth
Контроль Control	4.1 ± 0.48	6.5 ± 0.91	10.60 ± 0.86	10.35 ± 0.34	30.42 ± 1.77	3.27 ± 0.18	Отсутствуют None
250 мг/кг м. т. mg/kg b.w.	5.6 ± 0.40	5.8 ± 0.77	11.40 ± 0.76	10.28 ± 0.28	29.12 ± 0.85	2.95 ± 0.11	Отсутствуют None
500 мг/кг м. т. mg/kg b.w.	3.64 ± 0.67	6.55 ± 0.79	10.18 ± 0.67	8.32 ± 1.27*	25.40 ± 4.52*	3.28 ± 0.17	Отсутствуют None
1000 мг/кг м. т. mg/kg b.w.	4.73 ± 0.52	6.00 ± 0.60	10.73 ± 0.70	8.31 ± 1.31*	24.49 ± 4.24*	3.22 ± 0.20	Отсутствуют None

Примечание. * – статистическая значимость ($p < 0,05$); ** – ρ Спирмена = $-0,625$; $p = 0,000$; *** – ρ Спирмена = $-0,497$; $p = 0,001$.
Note: * Statistical significance ($p < 0.05$); ** Spearman's $\rho = -0.625$, $p = 0.000$; *** Spearman's $\rho = -0.497$, $p = 0.001$.

В исследовании не наблюдали значимых изменений ($p > 0,05$) массы тела животных родительского поколения в критические точки: для самцов – после спаривания, для самок – на 13-й день после родов. Общая масса потомства в опыте была значимо дозозависимо снижена как на 4-й день (ρ Спирмена = $-0,625$; $p = 0,000$), так и на 13-й день после родов (ρ Спирмена = $-0,497$; $p = 0,001$) по сравнению с контролем (табл. 1). У самцов крыс во всех группах не были обнаружены соски на 13-й день после рождения, аногенитальное расстояние у детёнышей животных в опыте и контроле не отличалось.

В исследовании не было выявлено значимых изменений гематологических показателей крови самок в конце исследования и самцов после завершения спаривания.

Биохимический анализ выявил значительное дозозависимое снижение содержания триглицеридов (ммоль/л) в крови самок, получавших 2-этилгексановую кислоту в дозе 1000 мг/кг м. т. на протяжении исследования (ρ Спирмена = $-0,436$; $p = 0,005$) (табл. 2). Иммуноферментный анализ показал, что уровни общего тироксина, тиреотропного гормона у крыс-родителей значимо не отличались у животных в опытных группах и контроле. При этом у детёнышей-самок, отобранных на 4-й день после рождения, наблюдали статистически значимое дозозависимое

повышение (ρ Спирмена = $0,586$; $p = 0,000$) тироксина, однако данные изменения не были отмечены у детёнышей, отобранных на 13-е сутки после рождения (табл. 3).

Гистологическое исследование показало, что при максимальном воздействии 2-этилгексановой кислоты в дозе 1000 мг/кг м. т. среди изученных структурно-функциональных показателей не было выявлено статистически значимых отличий от контрольных значений в следующих органах самцов и самок: сердце, семенники, селезёнка, тонкий и толстый кишечник, желудок, почки, печень, предстательная железа, придатки, матка, головной мозг. Вместе с тем 2-этилгексановая кислота в дозе 1000 мг/кг м. т. вызвала значимые изменения ($p < 0,05$) у самцов и самок в мочевом пузыре (увеличение склероза в подслизистой основе), лёгких (увеличение доли эмфизематозно изменённой паренхимы), надпочечниках (увеличение альтерации клеток и липоматозных включений).

При этом в щитовидной железе самок и самцов крыс, подвергшихся воздействию 2-этилгексановой кислоты, наблюдали значимое повышение числа фолликулов в состоянии гипофункции, а также тенденцию к увеличению (в три раза) локусов интерфолликулярной ткани у животных, получавших дозу 1000 мг/кг м. т., что характерно и для крыс, получавших дозу 500 мг/кг м. т.

Таблица 2 / Table 2

Биохимический анализ крови самок крыс в конце исследования
Biochemical analysis of blood in female rats at the end of the study

Группа Group	Мочевая кислота (мкмоль/л) Uric acid (μmol/L)	Мочевина (моль/л) Urea (mol/L)	Общий белок (г/л) Total protein (g/L)	Триглицериды (моль/л)** Triglycerides (mol/L)**	Хлориды (моль/л) Chlorides (mol/L)	Холестерин (Е/л) Cholesterol (U/L)	Холинэстераза (Е/л) Cholinesterase (U/L)	Щелочная фосфатаза (Е/л) Alkaline phosphatase (U/L)
Контроль Control	206.98 ± 11.83	7.66 ± 0.43	57.86 ± 1.03	0.76 ± 0.04	77.92 ± 0.72	1.94 ± 0.08	451.57 ± 75.34	407.78 ± 33.11
250 мг/кг м.т. mg/kg b.w.	187.50 ± 11.44	8.43 ± 0.42	59.50 ± 0.76	0.74 ± 0.04	75.94 ± 0.68	1.75 ± 0.05	397.66 ± 33.86	519.48 ± 48.83
500 мг/кг м. т. mg/kg b.w.	196.02 ± 11.93	6.67 ± 0.25	60.09 ± 0.73	0.73 ± 0.05	75.05 ± 0.79	1.86 ± 0.05	371.47 ± 34.74	450.89 ± 30.42
1000 мг/кг м. т. mg/kg b.w.	186.89 ± 8.71	7.93 ± 0.34	59.28 ± 1.03	0.58 ± 0.04*	75.26 ± 1.05	1.94 ± 0.09	542.95 ± 54.76	426.17 ± 55.64

Примечание. * – статистическая значимость ($p < 0,05$); ** – ρ Спирмена = $-0,436$, $p = 0,005$.
Note: * Statistical significance ($p < 0.05$); ** Spearman's $\rho = -0.436$, $p = 0.005$.

Таблица 3 / Table 3

Иммуноферментный анализ тиреоидных гормонов (тироксин общий и тиреотропный гормон) у крыс-детёнышей
Enzyme immunoassay of thyroid hormones (total thyroxine and thyroid-stimulating hormone) in rat offspring

Группа Group	Самки-детёныши на 4-й день после рождения Female offspring on the 4 th day after birth		Самки-детёныши на 13-й день после рождения Female offspring on the 13 th day after birth		Самцы-детёныши на 13-й день после рождения Male offspring on the 13 th day after birth	
	Тироксин общий (нмоль/л)** Total thyroxine (nmol/L)**	Тиреотропный гормон (мМЕ/л) Thyroid-stimulating hormone (mIU/L)	Тироксин общий (нмоль/л) Total thyroxine (nmol/L)	Тиреотропный гормон (мМЕ/л) Thyroid-stimulating hormone (mIU/L)	Тироксин общий (нмоль/л) Total thyroxine (nmol/L)	Тиреотропный гормон (мМЕ/л) Thyroid-stimulating hormone (mIU/L)
Контроль Control	30.04 ± 2.52	0.31 ± 0.04	93.71 ± 7.57	0.32 ± 0.04	105.66 ± 6.55	0.32 ± 0.03
250 мг/кг м. т. mg/kg b.w.	31.96 ± 2.44	0.29 ± 0.03	98.26 ± 5.65	0.32 ± 0.03	109.62 ± 3.74	0.35 ± 0.06
500 мг/кг м. т. mg/kg b.w.	36.28 ± 1.46	0.37 ± 0.06	102.62 ± 4.17	0.39 ± 0.06	107.51 ± 4.69	0.54 ± 0.10
1000 мг/кг м. т. mg/kg b.w.	41.96 ± 2.06*	0.43 ± 0.08	82.07 ± 11.89	0.48 ± 0.08	110.71 ± 3.57	0.55 ± 0.10

Примечание. * – статистическая значимость ($p < 0,05$); ** – ρ Спирмена = 0,586, $p = 0,000$.
Note: * Statistical significance ($p < 0.05$); ** Spearman's $\rho = 0.586$, $p = 0.000$.

Обсуждение

На основании результатов исследования можно заключить, что доза 250 мг/кг м. т. 2-этилгексановой кислоты может быть принята как недействующая, в то время как дозы 500 и 1000 мг/кг м. т. могут быть признаны действующими на основании снижения общей массы потомства в опытных группах на 4-й (ρ Спирмена = $-0,625$; $p = 0,000$) и на 13-й дни после родов (ρ Спирмена = $-0,497$; $p = 0,001$) по сравнению с контролем, а также на основании значительного дозозависимого снижения содержания триглицеридов (ммоль/л) в крови самок, получавших 2-этилгексановую кислоту в дозе 1000 мг/кг м. т. на протяжении исследования (ρ Спирмена = $-0,436$; $p = 0,005$). Органы и ткани животных, получавших 2-этилгексановую кислоту в дозе 250 мг/кг м. т., значимо не отличались от органов и тканей контрольных животных.

Полученные результаты подтверждают ряд данных литературы. В первом исследовании по методу ОЭСР № 422 кислоту вводили самцам крыс в дозах 1538; 4615 и 15385 ppm (82–86; 248–253 и 761–797 мг/кг м. т. соответственно) ежедневно с кормом (две недели до спаривания, период спаривания и примерно две недели после) и самкам крыс (две недели до спаривания, период спаривания, 22 дня беременности и до 4-го дня лактации) [5, 8]. В ходе эксперимента не было зарегистрировано случаев летального исхода и клинических признаков, связанных с воздействием вещества. Гематологические исследования показали на 4–7-е сутки более низкие значения среднего объёма эритроцитов, средней концентрации эритроцитарного гемоглобина и ретикулоцитов в группе, получавшей высокую дозу, по сравнению с контрольной группой. Общее количество лейкоцитов, моноцитов и абсолютное количество нейтрофилов в крови самок из группы с высокой дозовой нагрузкой было выше, чем в контроле. Клинический анализ, проведённый на 4–7-е сутки, показал более низкую концентрацию общего белка и альбумина, чем в контроле, у самок из группы с высокой дозовой нагрузкой, в то время как соотношение альбумин/глобулин было выше. Клинический анализ, проведённый на 30-й день, показал увеличение содержания желчных кислот у самцов, получавших высокую дозу. Относительная масса печени была увеличена у самцов и самок, получавших высокие дозы вещества. Абсолютная и относительная масса тимуса были ниже у самок, получавших высокую дозу, по сравнению с контролем. Относительная масса почек была увеличена у самцов, получавших высокую дозу. Микроскопическое

исследование показало повышенную частоту появления белковых капель в почечных канальцах самцов, получавших высокую дозу. Частота экстрамедуллярного кроветворения в селезёнке была снижена у самок, получавших высокую дозу.

Не наблюдалось никакого влияния на фертильность и репродуктивные показатели самцов и самок крыс; отсутствовало влияние на частоту живорождений и мертворождений, показатели жизнеспособности, соотношение полов потомства. Масса потомства из группы с высокой дозой была снижена на 4-й день (на 14%).

С учётом влияния на массу тела, потребление пищи, массу органов, гематологические и клинические показатели крови NOAEL общетоксического действия родительских особей (P0) составил 4615 ppm (248 мг/кг/день для самцов и 308 мг/кг/день для самок), NOAEL для фертильности родительских особей (P0) составил 15 385 ppm (761–797 мг/кг/день) [5, 8].

Во втором исследовании по методу ОЭСР № 433 «Расширенное изучение репродуктивной токсичности на одном поколении» тестируемое вещество вводили животным перорально в дозах 0; 1231; 3845 и 12 308 ppm с кормом в течение двух недель до спаривания, во время спаривания и беременности. В период лактации дозы были снижены вдвое [5, 8]. Клинических признаков, связанных с воздействием вещества, в ходе исследования не наблюдали. Масса тела и потребление пищи самцами и в меньшей степени самками животных группы с высокими дозами были незначительно, но статистически значимо снижены у большей части представителей поколений F0 и F1.

Считалось, что статистически значимое увеличение как абсолютной, так и относительной массы печени и почек у самцов и самок обоих поколений связано с воздействием вещества. Микроскопическое исследование выявило изменения в почках самцов поколения F0 и когорты 1A поколения F1, получавших высокую дозу. В поколении F0 наблюдали минимальное или умеренное накопление белковых капель в канальцах. У самцов когорты 1A наблюдали увеличение как частоты, так и тяжести накопления белка в канальцах. Увеличение частоты и тяжести образования базофильных канальцев наблюдали в группе, получавшей высокую дозу, по сравнению с контрольной.

Отсутствовало влияние на цикл эструса у животных поколения F0 и когорты 1A поколения F1; на фертильность и репродуктивные показатели самцов и самок крыс поколения F0 и когорты 1B поколения F1; на параметры придатков яичек и сперматозоидов у самцов поколения F0 и когорты 1A

поколения F1 и на показатели ТТГ и Т4 у животных поколения F0 и когорты 1A поколения F1.

При пероральном воздействии 2-этилгексановой кислоты на крыс не наблюдали влияния на частоту живорождений и мертворождений, индексы жизнеспособности, соотношения полов, массу детёнышей; клинические и макроскопические показатели поколения F1 и когорты 1B поколения F2; на параметры полового созревания (отделение препуции и раскрытие влагалища) у самок поколения F1; на массу органов у поколения F1; на развитие фолликулов из примордиальных мелких фолликулов в жёлтые тела.

Статистически значимые эффекты на аногенитальное расстояние после коррекции массы детёнышей, наблюдаемые у самцов поколения F1 на 4-й день после рождения, считались случайными, не связанными с воздействием вещества. Аногенитальное расстояние у самцов поколения F1 было выше, чем в контрольной группе, тогда как в случае эндокринной активности следовало ожидать его снижения. Кроме того, не наблюдали никакого влияния на аногенитальное расстояние на 0-й и 4-й дни после рождения у поколения F2.

Таким образом, в результате расширенного исследования репродуктивной токсичности одного поколения NOAEL для фертильности и репродуктивных показателей животных поколений F0 и F1, общих параметров и параметров полового развития, нейротоксичности и иммунотоксичности для развивающегося организма был на уровне 12 308 ppm. По результатам оценки влияния 2-этилгексановой кислоты на массу тела, потребление пищи, массу почек и печени и патологию почек у животных группы с высокой дозой NOAEL по общетоксическому действию для поколения P0 составил 3845 ppm (~ 245 мг/кг м. т.) [5, 8].

Следует отметить, что в аналогичных исследованиях с гептановой (CAS 111-14-8) и нонановой (CAS 112-05-0) кислотами также не наблюдали репротоксического эффекта. В тесте ОЭСР № 421 «Оценка репродуктивной/эмбри-

ональной токсичности скрининговым методом» при внутрижелудочном введении гептановой кислоты самкам крыс в дозах 200; 1000 и 2000 мг/кг м. т. в течение ~ 40 дней (7 дней до спаривания, периоды спаривания, беременности и до 4-го дня лактации) и самцам без затравки NOAEL по общетоксическому действию составил менее 200 мг/кг м. т. Доза 200 мг/кг м. т. вызвала появление хрипов у значительного числа крыс, дозы 1000 и 2000 мг/кг м. т. приводили к летальному исходу и потере массы тела; прирост массы тела самок и показатели потребления корма имели тенденцию к снижению в группах, принимавших до 2000 мг/кг м. т. на протяжении всего исследования, при этом масса тела самок значительно снижалась на 10-й и 16-й дни беременности и 4-й день лактации. Гептановая кислота не влияла на спаривание, фертильность, беременность, родоразрешение и не вызвала пороков развития или серьёзных поражений у потомства. NOAEL для фертильности родительских особей (P0) и токсичности для развития поколения F1 составил 1000 мг/кг м. т. Доза 2000 мг/кг м. т. приводила к снижению массы тела детёнышей на 4-й день после рождения [5].

При внутрижелудочном введении нонановой кислоты крысам в течение 6–15 дней беременности в дозах 200; 1000 и 2000 мг/кг м. т. NOAEL составил ≥ 2000 мг/кг для материнской токсичности и эмбриотоксического действия [5].

Заключение

Проведённые исследования показали, что 2-этилгексановая кислота не оказывает воздействия на репродуктивную функцию экспериментальных животных. Воздействие на развитие, выражающееся в снижении общей массы тела потомства, отмечено на уровне общетоксических доз и не является специфическим. Установлены значения NOAEL для родительских особей по общетоксическому действию на уровне 250 мг/кг м. т., по репротоксическому эффекту на уровне > 1000 мг/кг м. т.

Литература

(п.п. 4–20, 25, 26 см. References)

1. ГН 1.1.701–98. Гигиенические критерии для обоснования необходимости разработки ПДК и ОБУВ (ОДУ) вредных веществ в воздухе рабочей зоны, атмосферном воздухе населенных мест, воде водных объектов; 1998.
2. ГОСТ 12.1.007–76. ССБТ. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности (с изм. № 1,2); 1976.
3. Федеральный регистр потенциально опасных химических и биологических веществ. Доступно: <https://rpo.hv.ru/online/>
21. Хамидулина Х.Х., Тарасова Е.В., Замкова И.В., Назаренко А.К. Обоснование предельно допустимой концентрации 2-этилгексановой кислоты в воздухе рабочей зоны. *Токсикологический вестник*. 2024; 32(2): 72–86. <https://doi.org/10.47470/0869-7922-2024-32-2-72-86> <https://elibrary.ru/fvzibo>
22. ГОСТ 34555–2019. Межгосударственный стандарт. Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Определение токсичности при повторном/многократном воздействии с одновременным определением оценки репродуктивной/эмбриональной токсичности скрининговым методом. М.; 2019.
23. Руководство Р 1.2.3156–13. Оценка токсичности и опасности химических веществ и их смесей для здоровья человека. М.; 2013.
24. Халафян А.А. *STATISTICA 6. Статистический анализ данных*. М.: Бином-Пресс; 2007.

References

1. GN 1.1.701–98. «Hygienic criteria to substantiate the need to develop MAC and OEL (OAL) for hazardous substances in the air of the working area, atmospheric air in populated areas, water in water bodies»; 1998. (in Russian)
2. GOST 12.1.007–76. SSBT. Hazardous substances. Classification and general safety requirements (as amended No. 1,2); 1976. (in Russian)
3. Federal Register of Potentially Hazardous Chemical and Biological Substances. Available at: <https://rpo.hv.ru/online/> (in Russian)
4. CCOHS RTECS. Canadian Centre Occupational Health and Safety, Registry of Toxic Effects of Chemical Substances; 2023.
5. ECHA. European Chemicals Agency's Dissemination portal with information on chemical substances registered under REACH. Available at: <https://echa.europa.eu/home>
6. GESTIS Substance Database. Database on chemical compounds of the Institute for Occupational Safety and Health of the German Social Accident Insurance Society (IFA). Available at: <https://gestis-database.dguv.de/>
7. GHS Classification Results (J-GHS). National Institute of Technology and Evaluation /NITE/. Available at: https://www.safe.nite.go.jp/english/ghs/all_fy_e.html
8. Agency technical report on the classification and labelling of 2-ethylhexanoic acid and its salts, with the exception of those specified elsewhere in this list. Health and Safety Executive Chemicals Regulation Division; 2021.
9. Bui L.M., Taubeneck M.W., Commisso J.F., Uriu-Hare J.Y., Faber W.D., Keen C.L. Altered zinc metabolism contributes to the developmental toxicity of 2-ethylhexanoic acid, 2-ethylhexanol and valproic acid. *Toxicology*. 1998; 126(1): 9–21. [https://doi.org/10.1016/s0300-483x\(97\)00171-6](https://doi.org/10.1016/s0300-483x(97)00171-6)
10. Ambroso J.L., Frank E.R., Keller L.H., Trimmer G.W., Waterman S.J. Developmental toxicity assessment of C8 iso acid in CD rats: relevance to embryotoxic aliphatic carboxylic acids. *Toxicol. Sci.* 1999; 52(2): 240–7. <https://doi.org/10.1093/toxsci/52.2.240>
11. Pennanen S., Tuovinen K., Huuskonen H., Kosma V.M., Komulainen H. Effects of 2-ethylhexanoic acid on reproduction and postnatal development in Wistar rats. *Fundam. Appl. Toxicol.* 1993; 21(2): 204–12. <https://doi.org/10.1006/faat.1993.1090>
12. Pennanen S., Tuovinen K., Huuskonen H., Komulainen H. The developmental toxicity of 2-ethylhexanoic acid in Wistar rats. *Fundam. Appl. Toxicol.* 1992; 19(4): 505–11. [https://doi.org/10.1016/0272-0590\(92\)90088-y](https://doi.org/10.1016/0272-0590(92)90088-y)
13. Collins M.D., Scott W.J., Miller S.J., Evans D.A., Nau H. Murine teratology and pharmacokinetics of the enantiomers of sodium 2-ethylhexanoate. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1992; 112(2): 257–65. [https://doi.org/10.1016/0041-008x\(92\)90195-x](https://doi.org/10.1016/0041-008x(92)90195-x)
14. Dawson D.A. Additive incidence of developmental malformation for Xenopus embryos exposed to a mixture of ten aliphatic carboxylic acids. *Teratology*. 1991; 44(5): 531–46. <https://doi.org/10.1002/tera.1420440507>
15. Hauck R.S., Wegner C., Blumtritt P., Fuhrhop J.H., Nau H. Asymmetric synthesis and teratogenic activity of (R)- and (S)-2-ethylhexanoic acid, a metabolite of the plasticizer di-(2-ethylhexyl)phthalate. *Life Sci.* 1990; 46(7): 513–8. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(90\)90007-e](https://doi.org/10.1016/0024-3205(90)90007-e)

16. Hendrickx A.G., Peterson P.E., Tyl R.W., Fisher L.C., Fosnight L.J., Kubena M.F., et al. Assessment of the developmental toxicity of 2-ethylhexanoic acid in rats and rabbits. *Fundam. Appl. Toxicol.* 1993; 20(2): 199–209. <https://doi.org/10.1006/faat.1993.1027>
17. Narotsky M.G., Francis E.Z., Kavlock R.J. Developmental toxicity and structure-activity relationships of aliphatic acids, including dose-response assessment of valproic acid in mice and rats. *Fundam. Appl. Toxicol.* 1994; 22(2): 251–65. <https://doi.org/10.1006/faat.1994.1029>
18. Ritter E.J., Scott W.J. Jr., Randall J.L., Ritter J.M. Teratogenicity of di(2-ethylhexyl) phthalate, 2-ethylhexanol, 2-ethylhexanoic acid, and valproic acid, and potentiation by caffeine. *Teratology.* 1987; 35(1): 41–6. <https://doi.org/10.1002/tera.1420350107>
19. Svechnikova I., Svechnikov K., Söder O. The influence of di-(2-ethylhexyl) phthalate on steroidogenesis by the ovarian granulosa cells of immature female rats. *J. Endocrinol.* 2007; 194(3): 603–9. <https://doi.org/10.1677/JOE-07-0238>
20. Assessment report. Reconsideration of Nine Chemicals Listed under Proposition 65 as Known to Cause Reproductive Toxicity. Office of Environmental Health Hazard Assessment California Environmental Protection Agency; 2013. Available at: <https://oehha.ca.gov/media/downloads/proposition-65/chemicals/2013septdartichid.pdf>
21. Khamidulina Kh.Kh., Tarasova E.V., Zamkova I.V., Nazarenko A.K. Substantiation of maximum allowable concentration of 2-ethylhexanoic acid in the air of the working area. *Toksikologicheskii vestnik.* 2024; 32(2): 72–86. <https://doi.org/10.47470/0869-7922-2024-32-2-72-86> <https://elibrary.ru/fvzibo> (in Russian)
22. GOST 34555–2019. Methods of testing the chemicals of human hazard. Determination of repeated/multiple dose toxicity with simultaneous assessment of reproduction/developmental toxicity by screening method. Moscow; 2019. (in Russian)
23. Guide R 1.2.3156–13. Assessment of the toxicity and hazard of chemicals and their mixtures for human health. Moscow; 2014. (in Russian)
24. Khalafyan A.A. *STATISTICA 6. Statistical Data Analysis [STATISTICA 6. Statisticheskii analiz dannykh]*. Moscow: Binom Press; 2007. (in Russian)
25. Corder G.W., Foreman D.I. *Nonparametric Statistics: A Step-by-Step Approach*. Hoboken: John Wiley & Sons; 2014.
26. Agresti A. *Categorical Data Analysis*. Hoboken: John Wiley & Sons; 2003.

Сведения об авторах

Масальцев Глеб Викторович, канд. биол. наук, зав. отд. токсикологии и гигиены окружающей среды ФБУН «ФНЦГ им. Ф.Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора, Мытищи, Россия. E-mail: masalcev.gv@fncg.ru

Хамидулина Халидя Хизбулаевна, доктор мед. наук; директор филиала РПОХБВ ФБУН «ФНЦГ им. Ф.Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора; профессор, зав. каф. гигиены ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: director@rosreg.info

Тарасова Елена Владимировна, канд. хим. наук, зам. директора филиала РПОХБВ ФБУН «ФНЦГ им. Ф.Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора, Москва, Россия. E-mail: secretary@rosreg.info

Замкова Ирина Валентиновна, врач по санитарно-гигиеническим лабораторным исследованиям филиала РПОХБВ ФБУН «ФНЦГ им. Ф.Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора, Москва, Россия. E-mail: secretary@rosreg.info

Information about the authors

Gleb V. Masaltsev, MD, PhD, head of the Toxicology department of the Institute of Hygiene, Toxicology of Pesticides and Chemical Safety, Federal Scientific Center of Hygiene named after F.F. Erisman, Mytishchi, 141014, Russian Federation, <https://orcid.org/0000-0003-1539-1633> E-mail: masalcev.gv@fncg.ru

Khalidya Kh. Khamidulina, MD, PhD, DSci., Director of the Russian Register of Potentially Hazardous Chemical and Biological Substances – Branch of Federal Scientific Center of Hygiene named after F.F. Erisman; professor, Head of the Department of Hygiene of the Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, 121087, Russian Federation, <https://orcid.org/0000-0001-7319-5337> E-mail: director@rosreg.info

Elena V. Tarasova, MD, PhD, Deputy Director of the Russian Register of Potentially Hazardous Chemical and Biological Substances – Branch of Federal Scientific Center of Hygiene named after F.F. Erisman, Moscow, 121087, Russian Federation, <https://orcid.org/0000-0002-4020-3123> E-mail: secretary@rosreg.info

Irina V. Zamkova, MD, doctor of sanitary and hygienic laboratory research of the Russian Register of Potentially Hazardous Chemical and Biological Substances – Branch of Federal Scientific Center of Hygiene named after F.F. Erisman, Moscow, 121087, Russian Federation, <https://orcid.org/0000-0002-7959-7246> E-mail: secretary@rosreg.info