

Е. А. Калиниченко¹, К. О. Нагибина^{1, 2}, Н. Ф. Псарева², Л. В. Каниболоцкая¹

ОЦЕНКА ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ ЗАМЕЩЕННЫХ ГИДРОХИНОНОВ МОДИФИЦИРОВАННЫМ МЕТОДОМ ПРОБИТ-АНАЛИЗА

¹ Донецкий национальный университет, Украина, 21021, Винница, ул. 600-летия, 21.

² ООО "Стиролбиофарм", Украина, 84610, Горловка, ул. Горловской дивизии, 97;
e-mail: e.a.kalinichenko@gmail.com

Оценены значения полулетальных доз LD₅₀ метил-, бром-, хлорпроизводных гидрохинона. Оптимизирован расчетный способ пробит-анализа с применением метода наименьших квадратов Блисса — Прозоровского за счет использования предварительных результатов процедуры Up-and-Down OECD TG 425. Предложенная модификация позволяет уменьшить экономические затраты из-за сокращения количества вводимых доз и подопытных животных, а также может быть применена при тестировании веществ другими способами введения. Получены корреляционные зависимости между величинами токсичности гидрохинонов и константами диссоциации, позволяющие оценивать полулетальные дозы производных гидрохинона.

Ключевые слова: токсичность; QSAR; гидрохиноны; константы диссоциации; пробит-анализ; процедура Up-and-Down.

Фенольные соединения являются компонентами многих лекарственных и биологически активных соединений, композитов, исходными веществами при синтезе лекарственных препаратов. В то же время они известны как экотоксиканты. Образующиеся из них продукты окисления (в т.ч. диоксины, галогенорганические соединения) обладают высокой токсичностью и мутагенностью [1 – 3]. В водной среде дифенолы (к которым относятся гидрохиноны) способны активировать молекулярный кислород с образованием токсичных радикальных интермедиатов [4 – 7], которые вступают в реакцию с клеточными белками и нуклеиновыми кислотами, что приводит к их модификации: образованию аддуктов хинонов с нуклеофильными аминокислотами в белке; окислительно-восстановительным циклом [8, 9].

В качестве количественного критерия острой токсичности часто используют концепцию полулетальной дозы (LD₅₀). Организация по экономическому сотрудничеству и развитию (OECD) рекомендует для оценки значений острой токсичности использовать процедуру Up-and-Down OECD TG 425 (UDP) [10]. Альтернативным подходом для расчетов LD₅₀ является метод пробит-анализа, который базируется на принципе линеаризации S-образной дозовой кривой смертности [11].

Несмотря на многочисленные токсикологические исследования замещенных гидрохинона, данные острой оральной токсичности частичны. Для гидрохинона LD₅₀ составляет 390, 680 [12], 245 мг/кг [13], для его монометилзамещенного аналога LD₅₀ > 400 мг/кг [13], в то время как для триметилгидрохинона, а также моно/дигалоген-производных данные отсутствуют [13 – 17].

Целью данной работы стала оптимизация и объединение 2 подходов — метода пробит-анализа и UDP для оценки полулетальных доз при оральном введении, обнаружение корреляционных зависимостей между токсичностью гидрохинонов и их физико-химическими

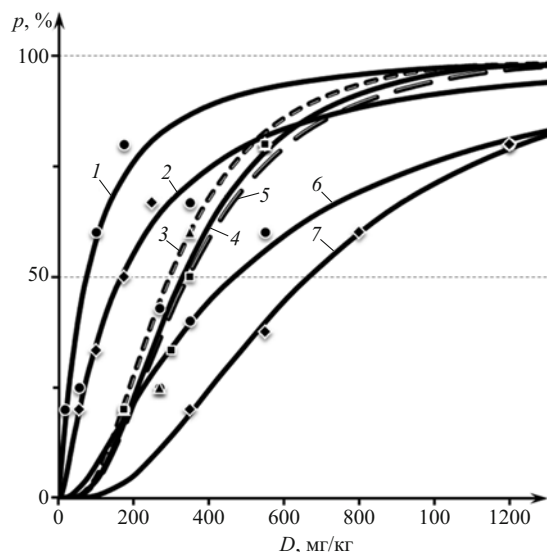
свойствами. Определяющим принципом являлась минимизация количества лабораторных животных при оценке полулетальных доз гидрохинонов.

Экспериментальная часть

Гидрохинон (*p*-QH₂, 99 %, Aldrich), бромгидрохинон (BrQH₂, 97 %, Aldrich), 2,5-дибромгидрохинон (2,5-Br₂QH₂, 97 %, Aldrich), хлоргидрохинон (ClQH₂, 85 %, Aldrich), 2,5-дихлоргидрохинон (2,5-Cl₂QH₂, 98 %, Aldrich), метилгидрохинон (MeQH₂, 98 %, Fluka), триметилгидрохинон (Me₃QH₂, 97 %, Aldrich) очищали сублимацией в вакууме.

Исследование острой токсичности гидрохинонов проводили на самках белой лабораторной мыши линии Balb/C массой (20 ± 3) г и возрастом около 2 мес. Мышей содержали без ограничения доступа к воде в условиях стационарного вивария с температурой воздуха на уровне (22 ± 3) °C и с суточным световым режимом (12 ч света и 12 ч темноты). Лабораторные мыши находились в клетках не менее 5 дней до начала введения тестируемого вещества, что позволяло им привыкнуть к лабораторным условиям. За 3 – 4 ч до внутрижелудочного введения веществ через зонд ограничивали доступ животных к кормушкам. Раствор готовили с использованием бидистиллированной воды перед каждым введением путем растворения навески вещества в 0,3 мл бидистиллированной воды. После введения соединений животных наблюдали ежедневно на протяжении 14 дней, в течение которых фиксировали изменения кожи и меха, глазных и слизистых оболочек, дыхательной и центральной нервной системы, соматомоторной активности и поведения. При выполнении исследования руководствовались принципами и критериями, изложенными в [18].

В качестве стандартной методики оценки значений полулетальных доз замещенных гидрохинонов для белой лабораторной мыши линии BALB/c выбрали UDP,



Дозовая кривая смертности для мыши линии BALB/c при внутривенном введении 2,5-Cl₂QH₂ (1), ClQH₂ (2), 2,5-Br₂QH₂ (3), BrQH₂ (4), p-QH₂ (5), Me₃QH₂ (6), MeQH₂ (7).

в которой четко прописаны стоп-критерии остановки испытаний [10].

Значения LD₅₀ рассчитывали как среднегеометрическое значение вводимых доз *n* животным из номинальной группы, состоящей из подопытных первого реверса и всех последующих за ними в серии. Для оценки статистической достоверности полученного результата LD₅₀ в процедуре UDP использовали метод максимального правдоподобия: если оба значения LR₁ и LR₂ превышают критическое, равное 2,5, то это служит стоп-критерием для тестирования данного вещества и является статистической мерой согласования исходных данных и полученного значения LD₅₀. Значения LR₁ и LR₂ определяли как отношение значений функций правдоподобия L₀ для μ₀ = lgLD₅₀ к значению L₁

для μ₁ = lg(LD₅₀/2,5) и L₂ для μ₂ = lg(LD₅₀ · 0,5) [10]. 95 % доверительный интервал (*p*) определяли в программе Acute Oral Toxicity (Guideline 425) Statistical Program ver.1.0 (© Westat under contract to EPA).

Для более точного определения значения LD₅₀ использовали метод [11], основанный на нахождении пробитов $y = \Psi(p_0) + 5$, где Ψ(*p*₀) — значения нормального эквивалентного отклонения, соответствующие процентам встречаемости гибели *p*₀. Чтобы не исключать из расчетов дозы токсикантов, при которых гибель составляет 0 и 100 %, воспользовались “исправленной” смертностью *p* [19].

Зависимость доза — эффект описывается уравнением прямой $y = a \cdot \lg D + b$. В модификации Блисса — Прозоровского значения весового коэффициента *k* экспериментальных точек, соответствующие различным значениям пробитов, рассчитывали по формуле:

$$k = \frac{1}{2\pi} \frac{10000}{p(100-p)} e^{-(y-5)^2}. \quad (1)$$

Расчет параметров *b* и *a* с учетом пробита “веса” осуществляли по уравнениям:

$$b = \frac{\sum k y \lg D - \frac{\sum k \lg D \cdot \sum k y}{\sum k}}{\sum k (\lg D)^2 - \frac{(\sum k \lg D)^2}{\sum k}}, \quad (2)$$

$$a = \frac{\sum k y - b \cdot \sum k \lg D}{\sum k}. \quad (3)$$

Из полученных экспериментальных значений параметров *b* и *a* легко определить значения LD₅₀ по формуле (4). 95 % доверительный интервал был вычислен по эмпирической формуле (5) [19].

$$LD_{50} = 10^{\frac{(5-a)}{b}}, \quad (4)$$

Таблица 1

Протокол тестирования UDP острой токсичности гидрохинонов

Соединение	Показатель	Шаг								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
p-QH ₂	D, мг/кг	175	550	175	550	175	550	-	-	-
	Результат	O	X	O	X	O	X	-	-	-
BrQH ₂	D, мг/кг	175	550	175	550	175	550	-	-	-
	Результат	O	X	O	X	O	X	-	-	-
2,5-Br ₂ QH ₂	D, мг/кг	175	550	175	550	175	550	-	-	-
	Результат	O	X	O	X	O	X	-	-	-
ClQH ₂	D, мг/кг	175	550	175	550	175	55	-	-	-
	Результат	O	X	O	X	X	O	-	-	-
2,5-Cl ₂ QH ₂	D, мг/кг	175*	55	17,5	55	175	55	175	55	-
	Результат	X	X	O	O	X	O	X	O	-
MeQH ₂	D, мг/кг	175*	550	2000	550	2000	550	175	550	2000
	Результат	O	O	X	O	X	X	O	O	X
Me ₃ QH ₂	D, мг/кг	175	550	175	550	2000	550	-	-	-
	Результат	O	X	O	O	X	X	-	-	-

* Не входят в номинальную группу животных.

$$\Delta LD_{50} = t \frac{10^{\frac{(6-a)}{b}} - 10^{\frac{(4-a)}{b}}}{2\sqrt{N}}, \quad (5)$$

где N — общее исходное количество животных в тех группах, для которых значения пробитов находятся в пределах от 3,5 до 6,5; t — t -критерий Стьюдента при $p < 0,05$ и числе степеней свободы, равном $N - 1$.

Результаты и их обсуждение

Исследование острой токсичности алкил- и галогенпроизводных гидрохинонов начали с процедуры UDP. Протокол испытаний приведен в табл. 1, в которой гибель подопытного животного обозначается “X”, а выживание в течение 2 недель после введения дозы вещества — “O”.

Для первых 3 веществ (табл. 1) наблюдается 5 реверсов в последовательности из 6 дозирования, что и послужило стоп-критерием [10]. Для всех остальных веществ стоп-критерием послужило превышение LR_1 и LR_2 значения 2,5.

При использовании данной методики для ряда веществ с одинаковым механизмом действия и с близкими параметрами токсичности наблюдается идентичная

картина протоколов (например, для $BrQH_2$, $2,5-Br_2QH_2$ и $p-QH_2$), несмотря на четкие стоп-критерии минимизации количества подопытных животных и наличие двухдневного интервала между этапами тестирования. Поэтому для получения более точных результатов использовали альтернативную методику оценки острой токсичности — метод пробит-анализа с применением расчетного метода наименьших квадратов Блисса — Прозоровского. Поскольку UDP плохо выполняется для токсикантов с небольшим наклоном кривой дозовой токсичности [20], уменьшили интервал доз для метилпроизводных. Такая модификация пробит-анализа позволила сократить время и затраты на проведение исследований за счет снижения количества необходимых подопытных животных.

Согласно [19], эмпирические значения смертности 0 и 100 % из-за малого объема выборки (число наблюдений $n = 3$) можно перевести в теоретические значения величин вероятности равные 20 и 80 % соответственно. В табл. 2 приведен протокол испытаний и параметры уравнения $y = a \cdot \lg D + b$, полученные по уравнениям (2) и (3).

Т а б л и ц а 2

Протокол тестирования токсичности гидрохинонов и параметры уравнения

Соединение	D , мг/кг	Количество животных		$P_{с\%}$	y	Параметры уравнения	
		выжило	погибло			a	b
$p-QH_2$	175	3	0	20,0	4,16	- 3,63	3,40
	300	4	2	33,3	4,57		
	350	3	3	50,0	5,00		
	550	0	3	80,0	5,84		
$BrQH_2$	175	3	0	20,0	4,16	- 4,22	3,66
	270	3	1	25,0	4,33		
	350	2	3	60,0	5,25		
	550	0	3	80,0	5,84		
$2,5-Br_2QH_2$	175	3	0	20,0	4,16	- 3,65	3,50
	270	4	3	42,9	4,82		
	350	2	4	66,7	5,43		
	550	0	3	80,0	5,84		
$ClQH_2$	55	3	0	20,0	4,16	1,10	1,75
	100	2	1	33,3	4,57		
	175	2	2	50,0	5,00		
	250	1	2	66,7	5,43		
	550	0	3	80,0	5,84		
$2,5-Cl_2QH_2$	17,5	3	0	20,0	4,16	1,80	1,71
	55	3	1	25,0	4,33		
	100	2	3	60,0	5,25		
	175	0	3	80,0	5,84		
$MeQH_2$	350	3	0	20,0	4,16	- 3,98	3,18
	550	5	3	37,5	4,68		
	800	2	3	60,0	5,25		
	1200	0	3	80,0	5,84		
Me_3QH_2	175	3	0	20,0	4,16	- 0,75	2,15
	270	3	1	25,0	4,33		
	350	3	2	40,0	4,75		
	550	2	3	60,0	5,25		
	1200	0	3	80,0	5,84		

На основании полученных данных построили дозовые кривые смертности мышей при внутрижелудочном введении замещенных гидрохинонов (рисунок).

Исходя из значений коэффициентов уравнения $y = a \cdot \lg D + b$, по уравнениям (4) и (5) были рассчитаны LD_{50} замещенных гидрохинонов и 95 % доверительные интервалы (p) (табл. 3).

В соответствии с “Согласованной на глобальном уровне системой классификации опасности и маркировки химической продукции” [21] 2,5-Cl₂QH₂, ClQH₂ и 2,5-Br₂QH₂ относятся к классу № 3 “умеренно опасных веществ”, а BrQH₂, *p*-QH₂, MeQH₂, Me₃QH₂ — к классу № 4 “малоопасных веществ”.

Признаки острого отравления гидрохинонами в исследованиях на лабораторных мышках линии BALB/c в первую очередь проявились в стимулирующем воздействии на центральную нервную систему (тремор, нарушение координации движений, повышенная возбудимость, тонические судороги, нарушение дыхания), а также патологическими изменениями в печени и почках.

Для прогнозирования токсичности гидрохинонов в рамках QSAR проведено сопоставление данных по LD_{50} и pK_a . Литературные данные констант диссоциации по 2 ступеням для BrQH₂ и 2,5-Br₂QH₂ отсутствуют, а константы для метил-, тетраметил- и 2,6-дихлоргидрохинона определены при ионной силе 0,65, то есть их нельзя напрямую использовать. Поэтому для оценки необходимых констант был предложен способ, основанный на нахождении линейной зависимости рассчитанных значений констант диссоциации в программном пакете (pK_{calc}) от экспериментальных значений констант $pK_a = \alpha pK_{calc} + \beta$. В работах [22, 23] были проанализированы прогнозы pK_a компьютерных программ, основанных на эмпирических методах, среди которых программа pK_a DB ACD Labs v.12.1 [24] показала наилучшие средние абсолютные отклонения от литературных данных.

В выборку вошли константы диссоциации первой и второй ступени для *p*-QH₂, ClQH₂, 2,5-Cl₂QH₂, Me₃QH₂, а также тетрахлор-, 2,3-дициано-, 2,5-диметилгидрохинонов [25, 26]. Проведен линейный регрессионный анализ корреляции экспериментальных и рассчитанных в пакете ACD Labs значений констант диссоциации гидрохинонов. Оценены константы дис-

социации для MeQH₂, BrQH₂ и 2,5-Br₂QH₂, исходя из полученных уравнений:

$$pK_{a1} = (1,267 \pm 0,051)pK_{calc1} + (-2,24 \pm 0,46), N = 7, \\ R^2 = 0,9917, SD = 0,226, F = 599,8,$$

$$pK_{a2} = (1,078 \pm 0,047)pK_{calc2} + (-1,21 \pm 0,53), N = 6, \\ R^2 = 0,9923, SD = 0,182, F = 517,8,$$

где N – число констант, включенных в корреляцию; R – коэффициент корреляции; SD – стандартное отклонение; F – критерий Фишера.

В качестве количественной меры токсичности принято использовать величины $\lg(1/LD_{50})$. Корреляция токсичности гидрохинонов от константы диссоциации по первой и второй ступени описывается следующими уравнениями:

$$\lg(1/LD_{50}) = (-0,21 \pm 0,08)pK_1 + (-0,5 \pm 0,8), N = 7, \\ R^2 = 0,584, SD = 0,220, F = 7,03,$$

$$\lg(1/LD_{50}) = (-0,19 \pm 0,09)pK_2 + (-0,26 \pm 0,97), N = 7, \\ R^2 = 0,507, SD = 0,240, F = 5,15.$$

Однако в данном случае более корректно использовать значение токсичности, выраженной не через LD_{50} в мг/кг, а через $LD_{M,50}$ в мкмоль/кг. Необходимость этого объясняется тем, что изученные вещества имеют одинаковый механизм токсичности, а также молекулярная масса субстратов отличается в диапазоне от 1,13 до 2,44 раза по сравнению с *p*-QH₂. Пересчитанные зависимости токсичности $\lg(1/LD_{M,50})$ от констант диссоциации описываются уравнениями:

$$\lg(1/LD_{M,50}) = (-0,29 \pm 0,07)pK_1 + (2,5 \pm 0,6), N = 7, \\ R^2 = 0,791, SD = 0,185, F = 18,9,$$

$$\lg(1/LD_{M,50}) = (-0,28 \pm 0,07)pK_2 + (2,9 \pm 0,9), N = 7, \\ R^2 = 0,734, SD = 0,209, F = 13,8.$$

Предложенная оптимизация метода пробит-анализа за счет использования результатов, полученных на первом этапе исследований согласно процедуре Up-and-Down OECD TG 425, позволяет получить бо-

Таблица 3

Значения LD_{50} замещенных гидрохинонов при оральном введении у мышей

Субстрат	UDP		Пробит-анализ	
	LD_{50} , мг/кг	p (95 %)	LD_{50} , мг/кг	p (95 %)
2,5-Cl ₂ QH ₂	65	35 – 155	75	1 – 149
ClQH ₂	211	43 – 1040	167	14 – 321
2,5-Br ₂ QH ₂	310	175 – 550	295	195 – 396
BrQH ₂	310	175 – 550	330	222 – 467
<i>p</i> -QH ₂	310	175 – 550	344	205 – 454
Me ₃ QH ₂	466	89 – 2430	467	134 – 799
MeQH ₂	773	381 – 1710	665	412 – 918

лее точные значения LD₅₀ и при этом сократить количество необходимых подопытных животных. Описанный подход можно использовать при тестировании острой токсичности не только при пероральном введении препаратов, но также для трансдермальных и парентеральных способов исследования различных веществ и препаратов. Получены корреляционные зависимости токсичности гидрохинонов с константами диссоциации. Такой подход позволяет предположить возможность оценки острой токсичности любого производного гидрохинона с использованием рассчитанных значений констант диссоциации при отсутствии литературных данных.

ЛИТЕРАТУРА

1. F. A. Anderson, W. F. Bergfeld, D. V. Belsito, et al., *Int. J. Toxicol.*, **29**, 274 – 287 (2010).
2. B. M. Jarrar, M. M. Alenezi, A. Al-Hiri, et al., *Am. J. Pharmacol. Toxicol.*, **7**, 19 – 26 (2012).
3. A. R. Vaughn, C. B. Redman, S. M. Kang, et al., *Advances Biosci. Biotechnol.*, **4**, 22 – 28 (2013).
4. V. Roginsky and T. Barsukova, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, **2**, 1575 – 1582 (2000).
5. A. Brunmark and E. Cadenas, *Free Radic. Biol. Med.*, **7**(4), 435 – 477 (1989).
6. F. Q. Schafer and G. R. Buetner, *Free Radic. Biol. Med.*, **30**(11), 1191 – 1212 (2001).
7. J. K. Dohrmann and B. Bergman, *J. Phys. Chem.*, **99**, 1218 – 1227 (1995).
8. T. A. McDonald, N. T. Holland, C. Skibola, *Leukemia*, **15**(1), 10 – 20 (2001).
9. World Health Organization, International agency for research on cancer. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Re-evaluation of Some Organic Chemicals, *Hydrazine and Hydrogen Peroxide*, Vol. 71, Cheney J., IARC Press, Lyon, France (1999).
10. OECD. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals No. 425: Acute Oral Toxicity — Up-and- Down Procedure*, Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France (2001).
11. C. I. Bliss, *Science*, **79** (2037), 38 – 39 (1934).
12. HYDRQUINONE CAS OECD SIDS UNEP PUBLICATIONS, №: 123-31-9.
13. United States National Library of Medicine: ChemIDplus advanced: <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/>
14. Canadian Centre for Occupational Health and Safety: <http://www.ccohs.ca/products/databases/cheminfo.html>
15. Envirofacts Master Chemical Integrator (EMCI): <http://www.epa.gov/enviro/html/emci/chemref/60297.html>
16. Material safety data sheet (MSDS): <http://hazard.com/msds/index.html>
17. Find chemicals in the ChemExper Chemical Directory: <http://www.chemexper.com/>
18. *OECD, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 19: Guidance Document on the Recognition Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation*, Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France (2000).
19. В. Б. Прозоровский, *Психофармакол. и биол. наркол.*, **7**(3), 2090 – 2120 (2007).
20. R. L. Lipnick, J. A. Cotruvo, R. N. Hill, et al., *Food Chem. Toxicol.*, **33**, 223 – 231 (1995).
21. *United Nations. Economic Commission for Europe. Globally harmonized system of classification and labelling of chemicals (GHS) Fifth revised edition*, New York and Geneva, United Nations (2013).
22. L. Chenzhong, M. C. Nicklaus, *J. Chem. Inf. Model*, **49**(12), 2801 – 2812 (2009).
23. H. Yu, R. Kühne, R. U. Ebert, *J. Chem. Inf. Model*, **51**(9), 2336 – 2344 (2011).
24. *Advanced Chemistry Development ACD / Labs Online v.2.0 (I-Lab)*, Toronto (2012), Режим доступа: <http://www.acdlabs.com/ilab/>.
25. J. G. Speight, *Lange's handbook of chemistry*, New York (2005).
26. T. Akutagawa, G. Saito, *Bul. Chem. Soc. Japan*, **68**(7), 1753 – 1774 (1995).

Поступила 09.06.15

EVALUATION OF THE ACUTE TOXICITY OF SUBSTITUTED HYDROQUINONES BY MODIFIED METHOD OF PROBIT ANALYSIS

Ye. A. Kalinichenko¹, K. O. Nagibina^{1,2}, N. F. Psareva², and L. V. Kanibolotska^{1*}

¹ Donetsk National University, 21021 Vinnytsia, Ukraine

² Stirolbiopharm Company, 84610 Gorlovka, Ukraine

* e-mail: l.kanibolotska@donnu.edu.ua

Average half-lethal dose (LD₅₀) values of methyl-, bromo-, and chlorosubstituted hydroquinones have been evaluated. The probit analysis calculations by Bliss – Prozorovsky least square method are optimized using preliminary results of up-and-down OECD TG 425 procedure. The proposed modification allows diminishing economic expenditures by reducing the number of feed doses and experimental animals, and can be applied on testing the substances by other methods of drug administration. Correlation dependences between the values of toxicity and dissociation constants have been obtained, which allows evaluation of average half-lethal doses of hydroquinone derivatives.

Keywords: toxicity; QSAR; hydroquinones; dissociation constants; probit analysis; up-and-down procedure.