

УДК 577:574.24:612.019:591.1:351.777.61

ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ РЯДА ФЕРМЕНТОВ ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ МЕТИЛФОСФОНОВОЙ КИСЛОТЫ САМЦАМ ЛАБОРАТОРНЫХ МЫШЕЙ

О.М. Плотникова^{1,2}, А.Н. Евдокимов¹, М.А. Григорович¹

¹Региональный центр по обеспечению контроля
и экологического мониторинга объекта по хранению
и уничтожению химического оружия по Курганской области

²Курганский государственный университет

Показано, что после внутримышечного введения самцам лабораторных мышей метилфосфоновой кислоты (МФК) в высоких (50, 2 мг/кг массы животного) и низких (10^{-12} , 10^{-15} , 10^{-18} мг/кг) дозах через 3 суток активность холинэстеразы, аспартат- и аланинаминотрансфераз плазмы крови уменьшалась в среднем на 20–40% (в отличие от средних доз МФК, введение которых мало влияло на активность этих ферментов); через 12 недель после введения низкой (10^{-15} мг/кг) дозы МФК активность ферментов повышалась на 20–70%. Пероральное введение МФК не приводило к достоверному изменению активности указанных ферментов.

Ключевые слова: метилфосфоновая кислота, активность аминотрансфераз, холинэстеразы, плазма крови лабораторных мышей.

Введение. Исследования устойчивости живых организмов к действию загрязняющих веществ антропогенного характера и в первую очередь ксенобиотиков, которые не входят в биотический круговорот, а являются прямым или косвенным продуктом хозяйственной деятельности человека, является актуальным, так как ксенобиотики прочно вошли в нашу жизнь. Наиболее опасными ксенобиотиками окружающей среды (Программа ООН по окружающей среде, 2005 г.) наряду с хлорорганическими соединениями и тяжелыми металлами, являются фосфорорганические соединения (ФОС), поэтому проведение исследований по выявлению влияния ФОС на живые, и особенно на теплокровные, организмы является актуальным.

Особый интерес к проблеме загрязнения ФОС окружающей среды в настоящее время вызван, во-первых, широким использованием фосфонатов в сельском хозяйстве в виде инсектицидов (хлорофос) и гербицидов (глифосат), во-вторых, идущим в России уничтожением фосфорорганических отравляющих веществ – зарина, зомана, ви-икс, в результате гидролитического разложения которых образуются эфиры и соли метилфосфоновой кислоты (МФК). Результаты уничтожения химического оружия (ХО) в США подтверждают возможность

загрязнения метилфосфонатами природных сред [10; 15; 18], а исследования воздействия глифосата на живые организмы не исключают его влияния на выработку половых гормонов [17], активность детоксицирующих ферментов в печени крыс [14], а также его мутагенность [16].

Федеральный закон «Об уничтожении химического оружия» при проведении работ по хранению и уничтожению ХО одной из основных задач ставит оценку состояния окружающей среды в зонах защитных мероприятий [13]. Образующиеся после уничтожения ХО отходы попадают под действие «Санитарных правил по определению класса опасности токсичных отходов производства и потребления», согласно которым в целях предотвращения вредного воздействия токсичных отходов на среду обитания и здоровье человека предусматривается экспериментальная оценка степени опасности отходов на теплокровный организм в остром и хроническом санитарно-токсикологическом эксперименте [12]. При этом важно учитывать, что специфические загрязняющие вещества в окружающей природной среде могут появляться, как правило, в малых и сверхмалых дозах.

В настоящее время влияние МФК на растительный и животный мир изучено недостаточно: имеются данные о влиянии МФК на рост и ферментативную активность растений [6; 11] и на биохимические субстраты метаболизма лабораторных мышей в краткосрочном эксперименте [7], поэтому изучение влияния МФК на живые организмы остается актуальным.

Одним из самых чувствительных показателей у живых организмов является активность ферментов, все чаще используемая при экологических и медицинских тестированиях. Так, мониторинг активности сывороточной холинэстеразы обязателен для людей, работающих с ФОС, в том числе при производстве и применении пестицидов, уничтожении ФОВ.

Исходя из вышесказанного, целью работы было изучение влияния различных доз МФК на активность важнейших ферментов печени лабораторных мышей – холинэстеразы (ХЭ), аспартат- (АСТ) и аланин- (АЛТ) аминотрансфераз.

Материал и методика. Исследования проводили на самцах лабораторных мышей (280 особей) линии СВА в возрасте 3-х месяцев массой 26 ± 2 г, которые содержались в стандартных условиях аттестованного вивария. Все работы с лабораторными мышами проводили согласно принципам гуманного отношения к животным в соответствии с международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных [2] и правилами лабораторной практики в Российской Федерации [8].

Животные были разделены на опытные и контрольные группы по

20 особей в каждой. Животным опытных групп вводили нейтрализованные водные растворы МФК соответствующей концентрации в объеме 0,1 мл (внутримышечно) или 1 мл (перорально), животным контрольных групп вводили физиологический раствор того же объема. После эвтаназии декапитацией у животных для исследования брали цельную кровь, из которой после центрифугирования получали плазму.

Работа выполнялась в два этапа. На первом этапе было изучено влияние различных доз МФК (50 , 2 , 10^{-3} , 10^{-6} , 10^{-9} , 10^{-12} , 10^{-15} , 10^{-18} мг/кг массы животного) на активность ферментов ХЭ, АСТ и АЛТ через 3 суток после внутримышечного введения МФК (острый эксперимент) и выявлены особенности изменения активности ферментов под воздействием высоких и низких доз МФК. На втором этапе было исследовано влияние на самцов лабораторных мышей высокой (2 мг/кг) и низкой (10^{-15} мг/кг) доз МФК после еженедельного введения в течение 12 недель растворов МФК одним группам мышей внутримышечно, другим – перорально (хронический эксперимент).

Совокупности полученных экспериментальных данных в каждой выборке обрабатывались все чаще используемыми в биологии и медицине методами непараметрической статистики [1]. Результаты исследования представляли в виде медианы, на основании которой считали различия значений в процентах (%) в опытных группах относительно контрольных групп. Интерквартильные размахи представлены в виде 25- и 75-го перцентилей. Достоверность различий между двумя выборками оценивали с использованием W -критерия Вилкоксона-Манна-Уитни для независимых выборок. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез в данном исследовании принимали менее 0,05.

Активность ферментов определяли кинетическим фотометрическим методом на биохимическом анализаторе StatFax 3300. Метод измерения ферментативной активности ХЭ основан на свойстве этого фермента гидролизовать бутирилтиохолин с образованием масляной кислоты и тиохолина, который восстанавливает окрашенный гексацианоферрат (III) до бесцветного гексацианоферрата (II) – скорость снижения оптической плотности раствора при длине волны 405 нм пропорциональна активности холинэстеразы [3]. При определении активности АСТ и АЛТ использованы свойства L-аспартата и L-аланина при взаимодействии с α -кетоглутаратом в присутствии соответствующей аминотрансферазы образовывать L-глутамат и оксалоацетат или пируват, которые восстанавливаются, соответственно, до яблочной (в присутствии малатдегидрогеназы) или молочной (в присутствии лактатдегидрогеназы) кислот в реакции с НАДН – скорость изменения оптической плотности растворов при

320 нм прямопропорциональна активности АСТ или АЛТ (наборный УФ-метод «ВекторБест» (г. Новосибирск).

Результаты и обсуждение. Для обсуждения полученных результатов в целях нивелировать различия, связанные с погрешностями текущего содержания животных, полом особей, все полученные показатели крови для животных опытных групп рассматривали в процентах относительно показателей крови животных в контрольных группах. У самцов лабораторных мышей контрольных групп ($n=20$) в период выполнения исследований для изучаемых ферментов были определены следующие значения активностей (мккат/л): для ХЭ – 113 (98–121), для АСТ – 4,37 (4,15–4,71), АЛТ – 1,14 (0,91–1,25); коэффициент де Ритиса составил 4,21 (3,31–4,93) (указаны медианы; 25- и 75-й перцентили).

Активность холинэстеразы (рис. 1) в плазме крови самцов через 3 суток после внутримышечного введения высоких (50 и 2 мг/кг) и низких (10^{-12} , 10^{-15} и 10^{-18} мг/кг) доз МФК уменьшалась на 18–42%, а после введения средних доз (10^{-3} , 10^{-6} , 10^{-9} мг/кг) – увеличивалась незначительно или достоверно не изменялась.

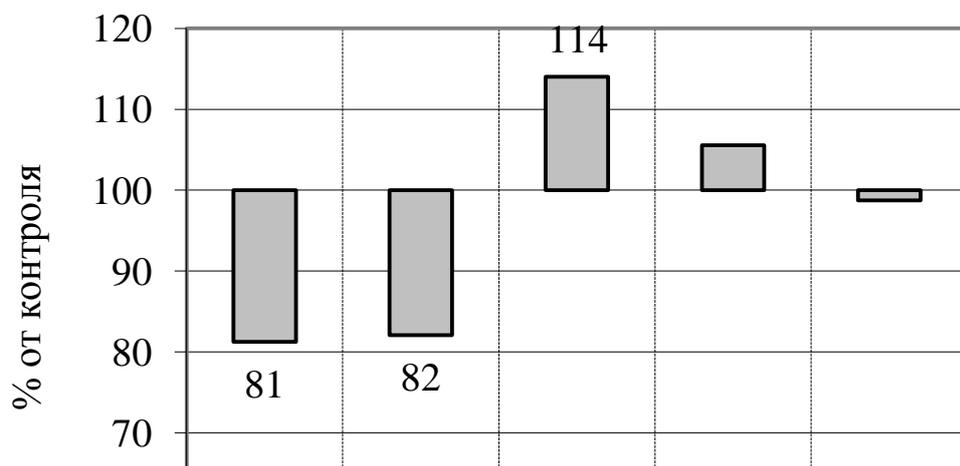


Рис. 1. Изменение активности холинэстеразы в плазме крови самцов лабораторных мышей через 3 суток после введения различных доз МФК: по оси абсцисс – значения концентраций МФК в мг/кг массы животного; процентные доли указаны только в случае достоверных отличий при $p < 0,05$

Известно, что снижение активности ХЭ в сыворотке характерно при отравлениях фосфорорганическими отравляющими веществами и инсектицидами. Кроме того, определение активности ХЭ представляет клинический интерес как показатель состояния белково-образующей функции печени [5].

Для изменения активности АСТ при введении различных доз МФК характерна волнообразная динамика (рис. 2). Достоверное

снижение активности АСТ было отмечено после введения МФК в высокой (50 мг/кг) и низких (10^{-12} и 10^{-15} мг/кг) дозах, а наибольший рост активности наблюдался после введения МФК в дозе 10^{-3} мг/кг.

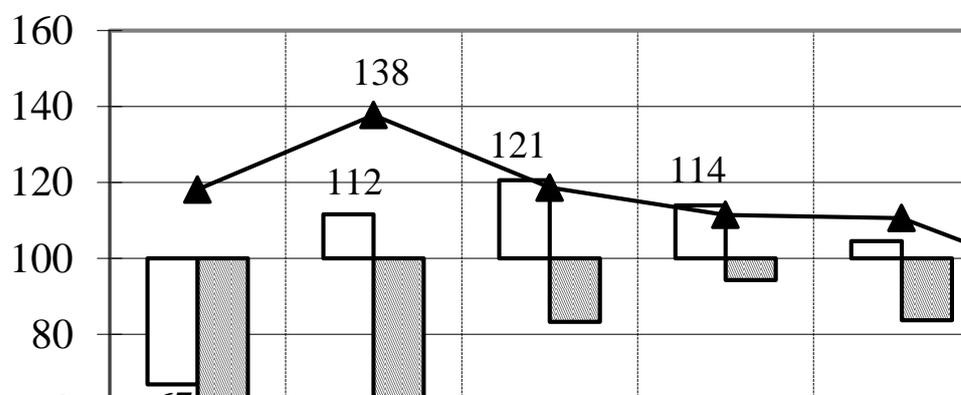


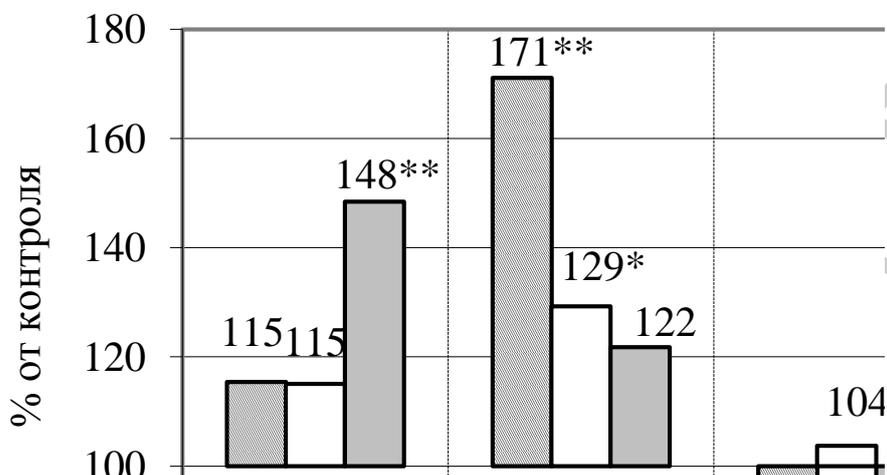
Рис. 2. Изменение активности АСТ (1) и АЛТ (2) и коэффициента де Ритиса (3) в плазме крови самцов лабораторных мышей через 3 суток после введения МФК: по оси абсцисс – дозы МФК в мг/кг массы животного; процентные доли указаны только в случае достоверных отличий при $p < 0,05$

Введение МФК во всех изученных дозах вызывало у самцов лабораторных мышей понижение активности АЛТ – максимально и примерно одинаково (на 39–45%) после введения МФК в высоких (50 и 2 мг/кг) и очень низкой (10^{-18} мг/кг) дозах; минимально и недостоверно – после введения средних доз МФК (рис. 2). Понижение активности АЛТ может быть вызвано дефицитом его кофермента – пиридоксальфосфата за счет переэтерификации с МФК, а также при состояниях, связанных с уменьшением гепатоцитов, способных синтезировать АЛТ.

Снижение активности АЛТ привело к увеличению интегрального показателя изменения активностей аминотрансфераз – отношения АСТ/АЛТ или коэффициента де Ритиса, отражающего состояние печени, который имел тенденцию к повышению в среднем на 10–20% (рис. 2). Однако после введения МФК в дозах 2 и 10^{-18} мг/кг массы животного коэффициент де Ритиса был повышен почти в 1,4 раза. Изменение коэффициента де Ритиса может быть использовано в качестве биохимического маркера воздействия загрязняющих веществ, в том числе окружающей среды [4; 9].

Для доз МФК 2 и 10^{-15} мг/кг, которые вызвали наибольшее число достоверных и максимальных изменений в изучаемых показателях, был выполнен хронический эксперимент, результаты которого обобщены на рис. 3. Из приведенных данных хорошо видно, что, во-первых,

еженедельное (в течение 12 недель) внутримышечное введение самцам лабораторных мышей растворов МФК сопровождалось повышением активности холинэстеразы и аминотрансфераз; во-вторых, пероральное введение МФК в течение трех месяцев не привело к достоверным изменениям в активности этих ферментов.



Р и с. 3. Изменение активности ХЭ (1), АСТ (2), АЛТ (3) в плазме крови самцов через 12 недель после внутримышечного и перорального введения высоких и низких доз МФК: по оси абсцисс – значения концентраций МФК в мг/кг; * – достоверные отличия при $p < 0,05$, ** – при $p < 0,005$

Важно отметить, что введение МФК в высокой дозе (2 мг/кг) приводило к достоверному повышению в 1,5 раза только активности АЛТ, а введение МФК в низкой дозе (10^{-15} мг/кг) достоверно повышало активности ХЭ и АСТ в 1,7 и 1,3 раза, соответственно, лишь при тенденции к повышению активности АЛТ.

Заключение. Результаты острого и хронического эксперимента показали, что метилфосфоновая кислота в высоких и очень низких дозах влияла на активность основных печеночных ферментов – ХЭ, АЛТ и АСТ, приводя через 3-е суток после внутримышечного введения, в основном, к уменьшению их активности; однако через 12 недель при хроническом воздействии как низкой (10^{-15} мг/кг), так и высокой (2 мг/кг) доз МФК снижение активности ферментов сменялось повышением их активности. Это может свидетельствовать о достаточных адаптационных возможностях гепатоцитов к кратковременным хроническим нагрузкам фосфорорганических ксенобиотиков. Показатели активности ХЭ и АЛТ, а также коэффициент де Ритиса могут быть использованы в качестве биохимических маркеров при оценке воздействия на теплокровные организмы метилфосфонатов в высоких и низких дозах.

Список литературы

1. *Гланц С.* Медико-биологическая статистика. М.: Практика, 1998. 459 с.
2. Международные рекомендации по проведению медико-биологических исследований с использованием животных // *Ланималогия*. 1993. № 1. С. 29.
3. Методика выполнения измерений биохимических показателей в плазме (сыворотке) крови мелких теплокровных животных фотометрическим методом. Свидетельство об аттестации МВИ № 22.11.03.052/2009. Курган: РЦ СГЭКиМ, 2009. 42 с.
4. *Мусаев Б.С., Курбанова И.К., Магомедгаджиева Д.Н., Мурадова Г.Р., Рабаданова А.И., Маржиева А.З., Шихмагомедова Р.М.* Динамика активности аминотрансфераз и щелочной фосфатазы в крови сеголеток карпа при хроническом воздействии ионов кадмия и марганца // *Биологические ресурсы: фауна*. 2010. № 1. С. 1321–1324.
5. *Назаренко Г.И., Кишкун А.А.* Клиническая оценка результатов лабораторных исследований. М.: Медицина, 2006. 544 с.
6. *Огородникова С.Ю., Головки Т.К., Ашихмина Т.Я.* Реакции растений на действие метилфосфоновой кислоты // *Теоретическая и прикладная экология*. 2007. № 1. С. 78–93.
7. *Плотникова О.М., Савинова И.В., Матвеев Н.Н., Корепин А.М., Евдокимов А.Н., Лунева С.Н.* Особенности влияния различных доз метилфосфоновой кислоты на основные биохимические показатели метаболизма лабораторных мышей // *Вестн. Челяб. гос. пед. ун-та*. 2011. № 1. С. 307–316.
8. Правила лабораторной практики в Российской Федерации: приложение к приказу МЗ РФ № 267 от 19.06.2003: [Электрон. ресурс]. Режим доступа: <http://www.msu.ru/bioetika/doc/267.doc> (дата обращения: 12.07.2012).
9. *Рощина О.В.* Влияние природных и антропогенных факторов на активность ферментов сыворотки крови черноморских рыб (на примере морского ерша): автореф. дис ... канд. биол. наук. М., 2010. 25 с.
10. *Савельева Е.И., Зенкевич И.Г., Кузнецова Т.А., Радилов А.С., Пиеничная Г.В.* Исследование продуктов превращений фосфорорганических отравляющих веществ методом газовой хроматографии-масс-спектрографии // *Рос. хим. журн. (Журн. Рос. хим. о-ва им. Д.И. Менделеева)*. 2002. Т. XLVI, № 6. С. 82–91.
11. *Серебрякова Н.Н.* Влияние ксенобиотиков на физиологию и биохимию листостебельных мхов // *Вестн. Оренбург. гос. ун-та*. 2007. № 12. С. 71–75.
12. СП 2.1.7.2570-10. Санитарные правила по определению класса

- опасности токсинных отходов производства и потребления: [Электрон. ресурс]. Режим доступа: <http://docs.cntd.ru/document/902198924> (дата обращения: 12.07.2012).
13. ФЗ–№ 76. Федеральный закон «Об уничтожении химического оружия» от 02.05.1997: [Электрон. ресурс]. Режим доступа: <http://www.rg.ru/2005/12/19/ximorujie-fz.html> (дата обращения: 12.07.2012).
14. *Daruich J., Zirulnik F., Gimenez M. S.* Effect of the herbicide glyphosate on enzymatic activity in pregnant rats and their fetuses // *Environmental Research*. 2001. Vol. 85, № 3. P. 226–231.
15. *DeFrank J. J., Fry I. J., Earley J. P. Irvine R. L.* Biodegradation of VX/Water Hydrolysate // U.S. Army Edgewood Chemical Biological Center Aberdeen Proving Ground. MD 21010–5424. 2003. P. 6.
16. Glyphosate. Herbicide factsheet // *Journal of pesticide reform*. 2004. Vol. 24, № 4. P. 10–15.
17. *Lin V., Garry V.* Roundup inhibits steroidogenesis by disrupting steroidogenic acute regulatory (StAR) protein expression // *Environmental Health Perspectives*. 2000. Vol. 108. P. 769–776.
18. *Munro N.B., Talmage S.S., Griffin G.D., Waters L.C., Watson A.P., King J.F., Hauschild V.* The sources, fate and toxicity of chemical warfare agent degradation, products // *Environmental Health Perspectives*. 1999. Vol. 107, № 12. P. 933–974.

FEATURES OF ANY ENZYME CHANGES IN RESPONSE TO THE INTRODUCTION OF METILPHOSPHONIC ACID TO MALES OF LABORATORY MICE

O.M. Plotnikova^{1,2}, A.N. Evdokimov¹, M.A. Grigorovich¹

¹The Regional Center for Government and Ecological Control and Monitoring under the Objects of Storage and Distraction of Chemical Weapons in Kurgan region

²Kurgan State University

It is shown that after intramuscular introduction to males of laboratory mice methylphosphonic acid (MPA) in high (50, 2 mg/kg of animal weight) and low (10^{-12} , 10^{-15} , 10^{-18} mg/kg) doses over 3 days activity of a cholinesterase and aspartate - and alaninaminotranspherases blood plasma decreased on the average for 20–40% (in contrast to the average doses MPA, whose introduction little effect on the activity of these enzymes); 12 weeks after the introduction of low (10–15 mg/kg) dose of MPA activity enzymes increased by 20–70%. Oral administration of the MPA did not lead to significant changes in the activity of these enzymes.

Keywords: *methylphosphonic acid, the activity of transaminases, cholinesterase, blood plasma of laboratory mice.*

Об авторах:

ПЛОТНИКОВА Ольга Михайловна—кандидат химических наук, доцент кафедры физической и прикладной химии, ГОУ ВПО «Курганский государственный университет», научный руководитель Регионального центра по обеспечению контроля и экологического мониторинга объекта по хранению и уничтожению химического оружия по Курганской области, 640000, Курган, ул. Гоголя, д. 25, e-mail: plotnikom@yandex.ru

ЕВДОКИМОВ Александр Николаевич—научный сотрудник Регионального центра по обеспечению контроля и экологического мониторинга объекта по хранению и уничтожению химического оружия по Курганской области, 640022, Курган, ул. Сибирская, д. 8, e-mail: kurgan-rc@yandex.ru

ГРИГОРОВИЧ Максим Александрович—заведующий лабораторией экотоксикологии, Региональный центр по обеспечению контроля и экологического мониторинга объекта по хранению и уничтожению химического оружия по Курганской области, 640022, Курган, ул. Сибирская, д. 8, e-mail: kurgan-rc@yandex.ru