

Биохимические показатели лабораторных мышей в зависимости от времени интоксикации метилфосфонатом

© 2010. О.М. Плотникова, к.х.н., науч. руководитель, Н.Н. Матвеев, н.с.,
А.М. Корепин, н.с., И.В. Дуплякина, н.с.,
Региональный центр по обеспечению государственного
экологического контроля и мониторинга объектов по хранению
и уничтожению химического оружия по Курганской области,
e-mail: kurgan-rc@yandex.ru

В статье представлены данные результатов исследования биохимических показателей биологического материала лабораторных мышей для системы «биохимический показатель – время интоксикации – достоверность влияния токсиканта». В качестве токсиканта изучали метилфосфоновую кислоту как основное фосфорорганическое соединение, образующееся при уничтожении фосфорорганических отравляющих веществ. Результаты могут быть использованы в экологическом мониторинге состояния окружающей среды.

The article presents the results of research of biochemical indicators of laboratory mice biological material for system «biochemical indicator – intoxication time – reliability of influence toxic substance». The methyl phosphonic acid as a toxic substance has been studied because of it is basic organophosphorus compound, which has been produced in the results of destruction organophosphorus poisonous substances. These researches can be used in ecological monitoring of environmental state.

Ключевые слова: экотоксикологический мониторинг,
биохимические показатели, метилфосфоновая кислота
Key words: ecotoxicological monitoring, biochemical indicators,
methyl phosphonic acid

В Региональном центре по обеспечению государственного экологического контроля и мониторинга объектов по хранению и уничтожению химического оружия по Курганской области (РЦ СГЭКиМ) в 2008 году начала работу Межрегиональная лаборатория экотоксикологии, аккредитованная в Системе аккредитации аналитических лабораторий на техническую компетентность и независимость в проведении биохимических, иммунологических и морфологических исследований с использованием биологического материала. В настоящее время лабораторией получено свидетельство об аттестации методики выполнения измерений (№ 224.11.03.052/2009) биохимических показателей фотометрическим методом в плазме (сыворотке) крови мелких теплокровных животных (мышей и мелких грызунов на территориях санитарно-защитных зон и зон защитных мероприятий) в рамках государственного экологического мониторинга объектов хранения и уничтожения химического оружия.

Целью первого этапа работы лаборатории стало выявление в системе «биохимический показатель – время интоксикации – до-

стоверность влияния токсиканта» наиболее информативных важнейших биохимических показателей крови лабораторных мышей в ответ на интоксикацию специфическим поллютантом – метилфосфоновой кислотой (МФК), которая может потенциально появиться в природных средах после детоксикации фосфорорганических отравляющих веществ и распада ряда фосфорорганических пестицидов, – для дальнейшего их использования в экотоксикологическом мониторинге.

Для достижения поставленной цели данного исследования концентрация МФК как вещества 4 класса опасности была определена – 2 мг/кг массы тела. В дальнейших исследованиях эта концентрация МФК обозначена нами как сверхвысокая.

Объектами исследования служили около 300 особей белых лабораторных мышей линии СВА в возрасте двух месяцев массой 25–28 г. Мыши были разделены на группы по 10–12 особей в каждой: контрольные группы самцов и самок с введением физиологического раствора (0,9% NaCl) и опытные группы самцов и самок с интоксикацией метилфосфоновой кислотой в качестве поллютанта.

Таблица 1

Показатели энергетического обмена лабораторных мышей линии СВА

| Определяемый показатель, единицы измерения | Время после интоксикации метилфосфонатом в концентрации 2 мг/кг | | | | | | | | | |
|--|---|------------------|-------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|---------|---------|---------|
| | 12 час | 24 час | 48 час | 72 час | 96 час | 120 час | 120 час | 120 час | 120 час | 120 час |
| Гликоген в печени, мг/г ткани печени | контроль | 71,2 (66,9-76,9) | 67,4 (66,0-67,4) | 37,5 (35,1-47,1) | 37,8 (34,4-42,0) | 35,6 (33,8-42,1) | 36,0 (28,9-38,6) | | | |
| | опыт | 59,5 (53,5-66,9) | 94,6 (85,6-102,5) | 44,1 (40,9-55,4) | 32,1 (30,7-33,8) | 66,6 (47,3-70,0) | 52,0 (48,0-54,6) | | | |
| | p | p<0,05 | p<0,05 | p<0,05 | p<0,05 | p<0,05 | p<0,05 | | | |
| Гликоген в мышцах, мг/г ткани мышц | контроль | 59,6 (57,8-64,1) | 33,0 (31,4-36,1) | 70,5 (65,3-79,5) | 65,4 (63,4-66,8) | 27,5 (26,2-30,6) | 43,1 (40,0-45,4) | | | |
| | опыт | 59,9 (56,8-66,9) | 41,5 (39,7-43,8) | 59,3 (58,0-65,5) | 45,0 (43,6-48,1) | 37,8 (32,8-43,0) | 60,9 (54,8-72,4) | | | |
| | p | p>0,05 | p<0,05 | p<0,05 | p<0,05 | p<0,05 | p<0,05 | | | |
| Креатинфосфат в мышцах, мкг/г ткани мышц | контроль | 1,55 (1,26-1,71) | 1,79 (1,68-1,89) | 0,46 (0,32-0,53) | 1,69 (1,50-1,85) | 0,35 (0,32-0,39) | 0,12 (0,09-0,24) | | | |
| | опыт | 0,50 (0,44-0,60) | 1,44 (1,24-1,73) | 0,79 (0,62-0,95) | 0,43 (0,35-0,49) | 0,38 (0,25-0,54) | 0,39 (0,34-0,48) | | | |
| | p | p<0,05 | p<0,05 | p<0,05 | p<0,05 | p<0,05 | p<0,05 | | | |
| Креатинкиназа в сыворотке крови, Е/л | контроль | 1,27 (1,17-1,56) | 0,43 (0,34-0,50) | 1,35 (1,12-1,46) | 0,82 (0,70-0,94) | 0,12 (0,11-0,18) | 0,22 (0,16-0,26) | | | |
| | опыт | 1,38 (1,29-1,47) | 0,40 (0,38-0,43) | 1,06 (0,78-1,21) | 0,19 (0,17-0,24) | 0,22 (0,17-0,32) | 0,23 (0,14-0,28) | | | |
| | p | p>0,05 | p>0,05 | p<0,05 | p<0,05 | p<0,05 | p<0,05 | | | |
| Лактатдегидрогеназа в сыворотке крови, Е/л | контроль | 1,87 (1,40-2,38) | 2,01 (1,64-2,16) | 1,32 (1,09-1,42) | 1,21 (1,05-1,45) | 1,10 (1,01-1,22) | 2,23 (2,14-2,63) | | | |
| | опыт | 1,43 (1,34-1,91) | 1,16 (1,01-1,43) | 1,30 (1,12-1,61) | 1,42 (1,15-1,74) | 0,63 (0,57-0,79) | 1,93 (1,47-2,10) | | | |
| | p | p<0,05 | p<0,05 | p>0,05 | p<0,05 | p<0,05 | p<0,05 | | | |
| Креатинкиназа в сыворотке крови, Е/л | контроль | 0,80 (0,67-0,96) | 1,37 (1,33-1,54) | 1,02 (0,86-1,27) | 0,94 (0,80-1,16) | 1,84 (1,73-2,13) | 1,11 (1,05-1,38) | | | |
| | опыт | 0,56 (0,53-0,59) | 1,54 (1,52-1,54) | 1,51 (1,15-1,76) | 1,16 (0,90-1,35) | 1,59 (1,41-1,82) | 1,14 (1,02-1,24) | | | |
| | p | p<0,05 | p<0,05 | p<0,05 | p<0,05 | p>0,05 | p>0,05 | | | |
| Креатинкиназа в сыворотке крови, Е/л | контроль | 167 (141-211) | 385 (338-467) | 180 (147-223) | 273 (235-360) | 160 (151-191) | 475 (377-612) | | | |
| | опыт | 343 (273-377) | 310 (291-338) | 108 (72-120) | 413 (357-548) | 215 (187-288) | 598 (542-707) | | | |
| | p | p<0,05 | p<0,05 | p<0,05 | p<0,05 | p<0,05 | p<0,05 | | | |
| Лактатдегидрогеназа в сыворотке крови, Е/л | контроль | 138 (117-158) | 407 (345-449) | 443 (398-499) | 413 (381-558) | 195 (160-206) | 80,5 (69,1-93,9) | | | |
| | опыт | 179 (140-199) | 541 (410-603) | 71,5 (56,7-83,9) | 358 (283-399) | 482 (392-578) | 70,2 (57,1-94,6) | | | |
| | p | p<0,05 | p<0,05 | p<0,05 | p<0,05 | p<0,05 | p>0,05 | | | |
| Лактатдегидрогеназа в сыворотке крови, Е/л | контроль | 1121 (1058-1170) | 1956 (917-1178) | 988 (899-1093) | 769 (686-832) | 777 (631-842) | 993 (953-1120) | | | |
| | опыт | 1079 (869-1185) | 1020 (923-1044) | 1020 (893-1152) | 882 (858-929) | 642 (599-766) | 1166 (1147-1241) | | | |
| | p | p>0,05 | p>0,05 | p>0,05 | p<0,05 | p<0,05 | p<0,05 | | | |
| Лактатдегидрогеназа в сыворотке крови, Е/л | контроль | 869 (764-1001) | 988 (907-1047) | 793 (698-917) | 834 (750-947) | 1123 (1023-1239) | 1015 (793-1627) | | | |
| | опыт | 901 (850-936) | 998 (934-1069) | 761 (603-832) | 891 (884-923) | 1236 (1112-1330) | 842 (737-1071) | | | |
| | p | p>0,05 | p>0,05 | p>0,05 | p<0,05 | p<0,05 | p<0,05 | | | |

Интоксикация проводилась путем инъекций мышам подкожно физиологического раствора с добавлением МФК, нейтрализованного. Забор исследуемого материала производился через установленное время после интоксикации. После эвтаназии декапитацией для исследования брали цельную кровь, из которой получали центрифугированием сыворотку крови. Объем полученной сыворотки от одной особи варьировался от 0,4 до 0,7 миллилитров.

Совокупности полученных экспериментальных данных в каждой выборке описывали с помощью медианы и процентилей [1].

Достоверность различий между двумя выборками экспериментальных данных оценивали с применением методов непараметрической статистики для малых выборок с использованием критериев для независимых выборок – Вилкоксона-Манна-Уитни для числа наблюдений n от 12 до 40 [2] или рендомизации – при n от 5 до 12 [3].

Исследования проведены более чем по 15 важнейшим биохимическим показателям, в том числе по содержанию гликогена в печени и мышцах, креатинфосфата (КФ) и креатина в мышцах, олигопептидов (ОП) в плазме крови и эритроцитной массе, общего белка (ОБ), белковых фракций альбумина и глобулинов, холестерина, общих липидов (ОЛ), малонового диальдегида (МДА), активности аминотрансфераз, супероксиддисмутазы (СОД), креатинкиназы (КК), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), холинэстеразы в сыворотке крови по общеизвестным адаптированным методикам [4] и согласно МВИ [5].

Для определения показателя «время – достоверно значимые изменения» между опытными и контрольными группами мелких грызунов определяли различные биохимические показатели через 12, 24, 48, 72, 96 и 120 часов после интоксикации. Результаты экспериментальных исследований для самцов и самок по основным показателям энергетического, белкового и липидного обменов приведены в таблицах 1–3 в виде медианы с указанием в скобках интервала 25–75-процентилей; различия считали значимыми при вероятности $p < 0,05$.

Анализ представленных данных таблиц 1–3 показывает, что достоверные наибольшие изменения для большинства изученных показателей энергетического, белкового и липидного обменов при интоксикации мышей МФК в концентрации 2 мг/кг живой массы наблю-

даются после 72 час воздействия поллютанта (для 23 из 24 определяемых показателей, приведенных в таблицах для 72 час воздействия токсиканта, $p < 0,05$ в отличие от 48 и 96 час, когда только 18 и менее 16 показателей имеют достоверные отличия).

Таким образом, для дальнейшего проведения исследований по выявлению влияния различных концентраций МФК на гематологические и биохимические показатели мышей из общего пула крови нами рекомендовано использовать период в 72 час.

По данным рисунков 1 и 2 метилфосфовая кислота в сверхвысоких дозах оказывает наибольшее влияние на следующие биохимические показатели в сторону уменьшения или увеличения как у самцов, так и у самок лабораторных мышей: уменьшается содержание гликогена в печени на 15–31% и в мышцах – на 74–77%, ОП в плазме и эритроцитной массе – на 20–48% и 14–19% соответственно; увеличивается содержание КФ на 14–19%, ОБ – на 8–16% и активность ЛДГ на 7–15%.

Активность КК и отношение МДА/ОБ у самцов и самок лабораторных мышей достоверно изменяется противоположно: активность креатинкиназы у самцов увеличивается на 51%, а у самок уменьшается на 13%; у самцов отношение МДА/ОБ уменьшается на 5%, а у самок увеличивается на 60% к контролю.

По содержанию общих липидов и холестерина в силу половых различий закономерность следующая: у самцов лабораторных мышей содержание ОЛ уменьшается на 26%, а у самок – лишь на 1%, в то же время содержание холестерина уменьшается у самок на 20%, а у самцов – лишь на 4%.

Таким образом, по полученным экспериментальным данным можно сделать вывод, что для обнаружения влияния МФК как специфического поллютанта на организм мелких грызунов можно рекомендовать к использованию изменение в биологических пробах гликогена, креатинфосфата, олигопептидов, общего белка, липидов, холестерина, активностей креатинкиназы, лактатдегидрогеназы через 72 час после интоксикации метилфосфоновой кислотой. При интоксикации лабораторных мышей МФК в сверхвысоких концентрациях (2 мг на кг массы) наблюдаются следующие закономерности в изменении перечисленных показателей:

1) независимо от пола особи наблюдается уменьшение содержания гликогена

Таблица 2

Показатели белкового обмена лабораторных мышей линии СВА

| Концентрация субстрата, или активность фермента, единицы измерения | Время после интоксикации метилфосфонатом в концентрации 2 мг/кг | | | | | | | |
|--|---|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|--------|
| | 12 час | 24 час | 48 час | 72 час | 96 час | 120 час | | |
| Общий белок в сыворотке крови, г/л | контроль | 63,2 (61,6-65,3) | 61,6 (68,7-64,5) | 59,4 (57,8-61,5) | 54,4 (53,0-57,4) | 57,5 (56,1-62,5) | 58,6 (54,9-61,1) | |
| | опыт | 65,0 (61,6-65,7) | 62,6 (61,3-68,2) | 57,1 (54,4-57,7) | 58,9 (55,8-59,3) | 56,5 (54,2-58,6) | 55,8 (53,3-57,4) | |
| | p | p>0,05 | p>0,05 | p<0,05 | p<0,05 | p>0,05 | p<0,05 | p<0,05 |
| Олигопептиды в плазме крови, мг/мл | контроль | 76,2 (67,8-79,7) | 67,6 (59,7-70,0) | 56,1 (54,1-58,9) | 63,2 (56,1-70,3) | 63,0 (59,3-67,2) | 54,8 (52,3-55,7) | |
| | опыт | 70,6 (69,9-72,6) | 64,8 (61,9-70,6) | 56,3 (54,7-69,0) | 73,5 (71,2-78,0) | 63,7 (63,0-67,4) | 54,2 (50,1-58,2) | |
| | p | p>0,05 | p>0,05 | p>0,05 | p<0,05 | p>0,05 | p>0,05 | p>0,05 |
| Олигопептиды в эритроцитной массе, мг/мл | контроль | 0,13 (0,12-0,13) | 0,10 (0,10-0,11) | 0,64 (0,55-0,67) | 0,40 (0,33-0,41) | 0,15 (0,15-0,17) | 0,13 (0,13-0,14) | |
| | опыт | 0,15 (0,13-0,21) | 0,19 (0,17-0,22) | 0,59 (0,55-0,69) | 0,32 (0,29-0,37) | 0,15 (0,13-0,15) | 0,14 (0,14-0,15) | |
| | p | p<0,05 | p<0,05 | p>0,05 | p<0,05 | p<0,05 | p<0,05 | p<0,05 |
| Олигопептиды в эритроцитной массе, мг/мл | контроль | 0,15 (0,15-0,16) | 0,20 (0,17-0,22) | 0,50 (0,46-0,54) | 0,23 (0,22-0,26) | 0,17 (0,16-0,18) | 0,20 (0,19-0,23) | |
| | опыт | 0,16 (0,13-0,21) | 0,17 (0,16-0,17) | 0,45 (0,41-0,49) | 0,12 (0,10-0,14) | 0,16 (0,15-0,17) | 0,18 (0,18-0,20) | |
| | p | p<0,05 | p<0,05 | p<0,05 | p<0,05 | p>0,05 | p<0,05 | |
| Олигопептиды в эритроцитной массе, мг/мл | контроль | 0,17 (0,16-0,19) | 0,18 (0,17-0,19) | 2,98 (2,92-3,01) | 1,38 (1,19-1,48) | 0,17 (0,16-0,20) | - | |
| | опыт | 0,35 (0,33-0,39) | 0,16 (0,15-0,17) | 1,99 (1,62-2,16) | 1,13 (1,07-1,21) | 0,16 (0,15-0,16) | - | |
| | p | p<0,05 | p<0,05 | p<0,05 | p<0,05 | p<0,05 | - | |
| Олигопептиды в эритроцитной массе, мг/мл | контроль | 0,36 (0,28-0,41) | 0,27 (0,24-0,30) | 0,87 (0,81-0,99) | 0,22 (0,21-0,23) | 0,22 (0,20-0,23) | 0,21 (0,20-0,22) | |
| | опыт | 0,35 (0,33-0,39) | 0,36 (0,29-0,47) | 0,72 (0,64-0,78) | 0,19 (0,17-0,20) | 0,20 (0,18-0,22) | 0,23 (0,22-0,26) | |
| | p | p>0,05 | p<0,05 | p<0,05 | p<0,05 | p<0,05 | p<0,05 | p<0,05 |

Таблица 3

Показатели липидного обмена лабораторных мышей линии СВА

| Концентрация субстрата, или активность фермента, единицы измерения | Время после интоксикации метилфосфонатом в концентрации 2 мг/кг | | | | | | | |
|--|---|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|--------|
| | 12 час | 24 час | 48 час | 72 час | 96 час | 120 час | | |
| Общие липиды в сыворотке крови, г/л | контроль | 2,50 (2,25-2,92) | 3,55 (3,26-3,69) | 1,96 (1,73-2,33) | 2,26 (2,16-2,46) | 2,40 (2,09-2,71) | | |
| | опыт | – | 2,60 (2,47-2,82) | 2,39 (2,10-2,56) | 1,46 (1,30-1,72) | 2,75 (1,96-2,83) | 1,78 (1,67-2,12) | |
| | p | – | p>0,05 | p<0,05 | p<0,05 | p>0,05 | p<0,05 | p<0,05 |
| | контроль | 2,58 (2,38-2,81) | 2,60 (2,20-3,20) | 1,83 (1,65-2,07) | 2,96 (2,34-3,04) | 2,13 (1,79-2,38) | 1,63 (1,44-1,65) | |
| | опыт | 1,90 (1,71-2,21) | 2,40 (2,10-2,70) | 1,52 (1,33-1,72) | 2,70 (2,23-2,70) | 2,09 (2,00-2,65) | 1,69 (1,62-1,77) | |
| | p | p<0,05 | p<0,05 | p<0,05 | p<0,05 | p>0,05 | p>0,05 | p>0,05 |
| Холестерин в сыворотке крови, г/л | контроль | – | 0,85 (0,79-0,94) | 0,79 (0,56-0,88) | 1,07 (0,95-1,22) | 0,93 (0,82-1,01) | 0,99 (0,95-1,08) | |
| | опыт | – | 1,04 (0,97-1,17) | 0,88 (0,79-0,99) | 1,02 (0,89-1,14) | 0,88 (0,78-0,97) | 0,79 (0,69-0,84) | |
| | p | – | p<0,05 | p<0,05 | p>0,05 | p>0,05 | p<0,05 | p<0,05 |
| | контроль | 0,96 (0,90-1,00) | 0,95 (0,83-1,08) | 0,88 (0,77-0,92) | 0,81 (0,69-0,88) | 0,79 (0,74-0,86) | 0,74 (0,72-0,79) | |
| | опыт | 0,97 (0,87-1,08) | 0,80 (0,80-0,90) | 1,02 (0,89-1,14) | 0,69 (0,64-0,79) | 0,83 (0,79-0,90) | 0,77 (0,62-0,79) | |
| | p | p>0,05 | p>0,05 | p<0,05 | p<0,05 | p<0,05 | p>0,05 | p>0,05 |
| Малоновый диальдегид в сыворотке крови на мкг/1 г | контроль | – | 3,44 (2,78-3,90) | 2,45 (2,28-2,50) | 5,75 (5,44-6,40) | 3,00 (2,60-3,79) | 3,70 (3,32-4,73) | |
| | опыт | – | 2,40 (1,60-2,88) | 1,50 (1,40-1,74) | 5,46 (4,80-5,86) | 2,30 (1,94-2,69) | 6,21 (5,25-6,81) | |
| | p | – | p<0,05 | p<0,05 | p<0,05 | p<0,05 | p<0,05 | p<0,05 |
| | контроль | 4,76 (4,04-5,61) | 2,40 (1,92-2,90) | 5,15 (3,97-5,70) | 1,63 (1,10-1,84) | 4,07 (2,69-5,22) | 5,84 (5,26-6,87) | |
| | опыт | 4,22 (4,06-4,41) | 2,33 (2,16-2,63) | 4,57 (3,95-4,81) | 2,60 (2,12-3,12) | 2,71 (2,33-3,25) | 5,73 (5,06-6,51) | |
| | p | p<0,05 | p>0,05 | p>0,05 | p<0,05 | p<0,05 | p<0,05 | p>0,05 |
| Супероксиддисмутаза в сыворотке крови, мкг/л | контроль | – | 37,6 (32,7-42,7) | 52,4 (50,7-59,1) | 117 (109-125) | – | – | |
| | опыт | – | 55,1 (51,5-60,7) | 59,0 (55,2-70,1) | 114 (102-125) | – | – | |
| | p | – | p<0,05 | p<0,05 | p>0,05 | – | – | – |
| | контроль | 50,6 (41,1-54,6) | 93,4 (82,8-101) | 42,5 (39,4-46,8) | 44,1 (39,9-61,5) | – | – | |
| | опыт | 40,7 (38,1-48,5) | 102,4 (85,2-119) | 54,8 (50,0-60,3) | 59,5 (51,6-82,3) | – | – | |
| | p | p>0,05 | p>0,05 | p<0,05 | p<0,05 | – | – | – |

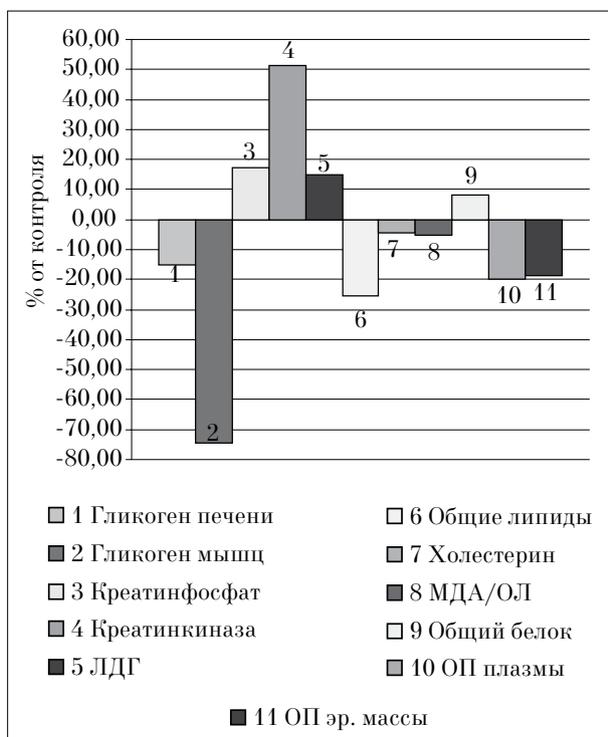


Рис. 1. Изменение биохимических показателей у самцов лабораторных мышей относительно контрольной группы при интоксикации метилфосфоновой кислотой

в печени до 30%, в мышцах – до 80% при одновременном увеличении креатинфосфата до 20%, уменьшение содержания олигопептидов в эритроцитной массе до 20% и особенно в плазме – до 50% при одновременном увеличении содержания общего белка до 10%;

2) для самцов – увеличение активностей креатинкиназы до 50% и лактатдегидрогеназы до 15%, уменьшение содержания общих липидов до 30%;

3) для самок – снижение активности креатинкиназы до 15%, уменьшение содержания холестерина до 20% и увеличение отношения МДА/ОЛ до 60%.

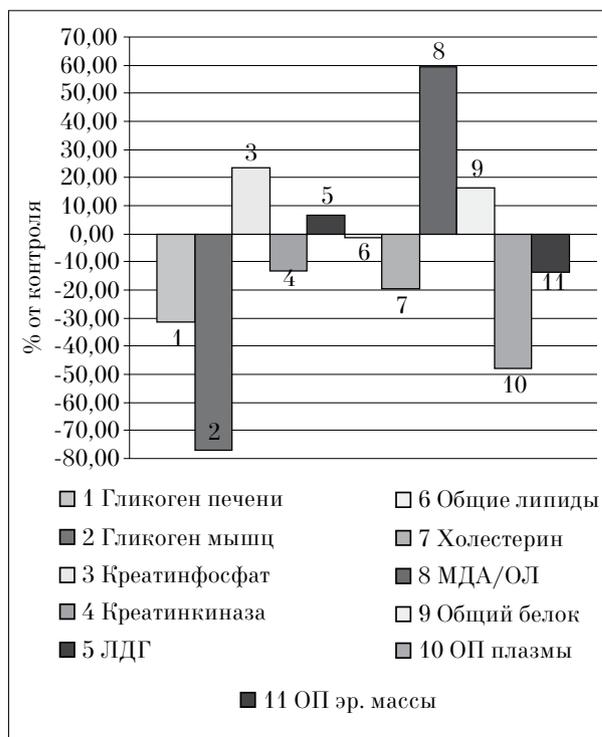


Рис. 2. Изменение биохимических показателей у самок лабораторных мышей относительно контрольной группы при интоксикации метилфосфоновой кислотой

Литература

1. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика, 1998. 459 с.
2. Гублер Е.В., Генкин А.А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. Л.: Медицина, 1973. 142 с.
3. Гайдышев И. Анализ и обработка данных: специальный справочник. СПб: Питер, 2001. 750 с.
4. Справочник по лабораторным методам исследования / Под ред. Л.А. Даниловой. СПб: Питер, 2003. 736 с.
5. Методика выполнения измерений биохимических показателей в плазме (сыворотке) крови мелких теплокровных животных фотометрическим методом; свидетельство об аттестации МВИ № 22.11.03.052/2009.