

## Биохимические показатели крови в оценке влияния метилфосфоната на лабораторных мышей в долговременном эксперименте

© 2011. О. М. Плотникова<sup>1,2</sup>, к.х.н., доцент, А. М. Корешин<sup>2</sup>, н.с.,  
Н. Н. Матвеев<sup>2</sup>, н.с., С. Н. Лунева<sup>3</sup>, д.б.н., зав. лабораторией,

<sup>1</sup>Региональный центр государственного экологического контроля  
и мониторинга объектов по хранению и уничтожению  
химического оружия по Курганской области,

<sup>2</sup>Курганский государственный университет,

<sup>3</sup>ФГУ «РНИЦ «ВТО» им. академика Г. А. Илизарова»,

e-mail: kurgan-rc@yandex.ru, plotnikom@yandex.ru, ruluneva\_s@mail.ru

Изучены биохимические показатели окислительной модификации белков (ОМБ) и активность фермента супероксиддисмутаза в крови лабораторных мышей через 3, 6, 12, 18 и 30 дней после подкожного введения метилфосфоновой кислоты (МФК) в высоких и низких дозах (2,  $10^{-3}$  и  $10^{-15}$  мг/кг). Показано, что введение мышам МФК сопровождается активацией перекисного окисления белков с образованием поздних маркеров ОМБ, содержание которых повышено даже через 30 суток после введения МФК.

The biochemical indices of proteins oxidative modification (POM) and the enzyme superoxide dismutase activity in blood of laboratory mice is studied in at 3, 6, 12, 18 and 30 days after subcutaneous injection of methyl phosphonic acid (MPA) in high and low doses (2,  $10^{-3}$  and  $10^{-15}$  mg / kg). It is shown that the injection of MPA to mice is accompanied by activation of protein peroxidation with the formation of late markers of OMB, the content of which is higher than average even 30 days after the injection of MPA.

Ключевые слова: метилфосфоновая кислота, окислительная модификация белков, супероксиддисмутаза, кровь лабораторных мышей

Key words: methyl phosphonic acid, oxidative modification of proteins, superoxide dismutase, the blood of laboratory mice

Появление в окружающей среде специфических загрязняющих веществ приводит к необходимости приспособления организмов к новым условиям, что заканчивается адаптацией или срывом адаптивных механизмов. Любые адаптивные процессы в живом организме протекают в условиях постоянного образования активных форм кислорода, свободных радикалов и работы антиоксидантной системы (АОС). Субстратами АОС являются любые низкомолекулярные вещества – «ловушки» радикалов – витамины А, С, Е, К, флавоноиды, тиолы, а ферментами – супероксиддисмутаза (СОД), глутатионпероксидаза, каталаза и др.

К специфическим загрязняющим веществам высокой физиологической активности, получившим широкое распространение в современном мире в виде инсектицидов и гербицидов, относятся фосфорорганические соединения [1, 2]. Среди них особо выделяются метилфосфонаты [3, 4], которые, как вещества особого строения с малополярной фосфор-углеродной связью (С-Р связь), могут быть источниками свободных радикалов

( $\cdot\text{CH}_3$  и  $\cdot\text{PO}_3\text{H}_2$ ) при разрыве С-Р связи. Образовавшиеся радикалы  $\cdot\text{CH}_3$  и  $\cdot\text{PO}_3\text{H}_2$  могут стать ловушками радикалов по реакции обрыва цепи радикальных процессов (например,  $\cdot\text{CH}_3 + \cdot\text{OH} = \text{CH}_3\text{OH}$  и  $\cdot\text{PO}_3\text{H}_2 + \cdot\text{OH} = \text{H}_3\text{PO}_4$ ) или источником электронов с образованием супероксидного анион-радикала кислорода  $\text{O}_2^{\cdot-}$  ( $\cdot\text{PO}_3\text{H}_2 - e + \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} = \text{O}_2^{\cdot-} + \text{H}_3\text{PO}_4$ ). Эти процессы могут приводить к интоксикациям и активации АОС организма.

Метилфосфоновая кислота (МФК), её соли и эфиры (метилфосфонаты) являются конечными и достаточно устойчивыми продуктами детоксикации фосфорорганических отравляющих веществ [5] в процессе происходящего в России уничтожения химического оружия, для утилизации которых разрабатываются специальные методы биодegradации [6]. Метилфосфонаты также могут появляться в природных средах в результате разложения фосфорсодержащих пестицидов в почве [7].

Влияние МФК на представителей растительного и животного мира изучено недостаточно. Имеются данные о влиянии МФК на рост и ферментативную активность растений

[8, 9], на биохимические показатели метаболизма в краткосрочном эксперименте [10, 11]. В связи с этим изучение влияния МФК на живые организмы остаётся актуальным.

Результаты ранее проведённых исследований по изучению влияния различных доз МФК (2,  $10^{-3}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-12}$ ,  $10^{-15}$  и  $10^{-18}$  мг/кг массы животного) в краткосрочном (от 12 до 120 час) эксперименте показали, что МФК оказывает влияние на биохимические показатели метаболизма лабораторных мышей [10, 11]. Было найдено, что максимальные изменения большинства показателей крови у лабораторных мышей наблюдались после введения животным МФК в высоких (2 и  $10^{-3}$  мг/кг) и в низких ( $10^{-12}$  и  $10^{-15}$  мг/кг) дозах в отличие от введения МФК в средних ( $10^{-6}$  и  $10^{-9}$  мг/кг) и сверхмалой ( $10^{-18}$  мг/кг) дозах. Также отмечено, что в большей степени МФК действует на антиоксидантную систему, приводя в основном к окислительной модификации белков.

Результаты краткосрочного эксперимента показали необходимость дальнейшего изучения введения высоких и низких доз МФК лабораторным мышам как тест-объектам с целью изучения в долгосрочном эксперименте динамики изменения показателей, характеризующих работу АОС, каковыми являются в первую очередь показатели окислительной модификации белков (ОМБ) или перекисного окисления белков (ПОБ) и активности фермента АОС супероксиддисмутазы.

### **Объекты и методы исследования**

В настоящем исследовании при изучении ОМБ определяли общий белок (ОБ) и продукты ПОБ в виде альдегидо- и кетодинитрофенилгидразонов (АФГ и КФГ), оценку работы АОС проводили по активности фермента СОД. Для характеристики патологических изменений в организме, которые могут происходить в результате ОМБ, в исследовании определяли маркеры эндогенной интоксикации (ЭИ), которыми являются олигопептиды (ОП), вещества низкой и средней молекулярных масс (ВНСММ) и катаболические фракции (КП) этих веществ в плазме и эритроцитарной массе крови.

Исследования проводили на лабораторных мышах (130 особей самцов) линии СВА в возрасте двух месяцев массой  $24 \pm 2$  г, которые содержались в стандартных условиях аттестованного вивария. Животным опытных групп (по 10 особей в каждой) подкожно вводили в объёме 0,04 мл нейтрализованные изотонические растворы МФК в высокой ( $10^{-3}$  мг/кг)

и низкой ( $10^{-15}$  мг/кг) дозах. Животным контрольных групп (10 особей в 3-суточном и 20 особей – для усреднения погрешностей текущего содержания животных – в 30-суточном эксперименте) вводили физиологический раствор того же объёма.

Через 3, 6, 12, 18 и 30 суток после введения растворов МФК у животных для исследования брали цельную кровь, из которой после центрифугирования получали плазму и эритроцитарную массу.

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 [12] и правилами лабораторной практики в Российской Федерации [13].

Совокупности полученных экспериментальных данных в каждой выборке не подчинялись законам нормального распределения, что оценивалось по критерию Шапиро-Уилка, и обрабатывались методами непараметрической статистики [14]. Поэтому 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-го 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.

В работе для определения изучаемых биохимических показателей крови лабораторных мышей использовали общепринятые методы лабораторной диагностики [15], которые были адаптированы к биоматериалу мелких грызунов с разработкой и аттестацией соответствующей методики [16].

Общий белок определяли спектрофотометрически биуретовым методом Кингслея-Вейксельбаума с регистрацией оптической плотности окрашенных белковых комплексов при длине волны 540 нм. После обработки плазмы крови трихлоруксусной кислотой (ТХУ) в супернатанте проводили определение олигопептидов в плазме (ОПл) спектрофотометрическим методом Лоури [17] при длине волны 750 нм, а в белковом осадке, промытом смесью этилацетата с этанолом и растворённом в подкисленном растворе мочевины, определяли продукты ПОБ по реакции

с 2,4-динитрофенилгидразином [18]. Продукты реакции регистрировали при длинах волн 270 нм (АФГ или ПОБ<sub>270</sub>), 363 нм и 370 нм (КФГ или ПОБ<sub>363+370</sub>). Степень окисленной модификации белков выражали в единицах оптической плотности (е.о.п.) на 1 мг белка. ВНСММ в плазме (ВНСММпл) определяли в супернатанте после осаждения крупномолекулярных белков плазмы раствором ТХУ путём регистрации спектра поглощения исследуемого раствора на спектрофотометре фирмы Janway в ультрафиолетовом диапазоне при 238–298 нм с шагом в 1 нм по методу М. Я. Малаховой [17]. ОП и ВНСММ в эритроцитах (ОПэр и ВНСММэр) определяли аналогично их обнаружению в плазме после промывания эритроцитарной массы физиологическим раствором и осаждения белков ТХУ в эритроцитарном супернатанте. Величину КП в плазме и эритроцитах (КПпл и КПэр), характеризующую накопление веществ катоболического происхождения, равную сумме экстинкций в интервале длин волн 238–258 нм, умноженной на шаг волны 4 нм, вычисляли при совместном определении ВНСММ. Активность СОД в эритроцитах определяли по реакции, основанной на способности фермента конкурировать с нитросиним тетразолием (НСТ) за супероксидные анионы (мкмоль НСТ на 109 эр/мин), образующиеся в результате аэробного взаимодействия НАДН и феназинметсульфата [15].

### Результаты и их обсуждение

При анализе и обсуждении полученных экспериментальных данных рассматривали

изменения изученных биохимических показателей крови лабораторных мышей опытных групп относительно контрольных групп, данные для которых приведены в таблице.

Анализ данных по содержанию ОБ в крови лабораторных мышей после введения им растворов МФК как в высоких, так и в низких дозах говорил об отсутствии значимых изменений: достоверные отличия не превышали 8–9% в течение всего срока эксперимента. На фоне практически нормальных значений для ОБ начиная с 12-х суток отмечался постепенный рост как раннего (АФГ), так и позднего (КФГ) маркеров окислительной деструкции белков. Содержание АФГ в плазме достигло максимума через 30 суток после введения высоких и низких доз МФК – увеличение на 29 и 33% соответственно (рис. 1).

Содержание КФГ – маркера глубокого окисления белковых полимеров – возросло на треть к 18-м суткам после введения МФК как в низкой, так и в высокой дозах. Важно отметить, что к 30-м суткам в случае введения высокой дозы МФК содержание позднего маркера ОМБ снизилось до значений в контрольной группе, а в случае введения низкой дозы МФК (10<sup>-15</sup> мг/кг), наоборот, произошло увеличение содержания КФГ в 1,7 раза. Таким образом, процессы ОМБ практически одинаковой интенсивности происходили как через трие суток, так и через 30 суток после введения низких доз МФК.

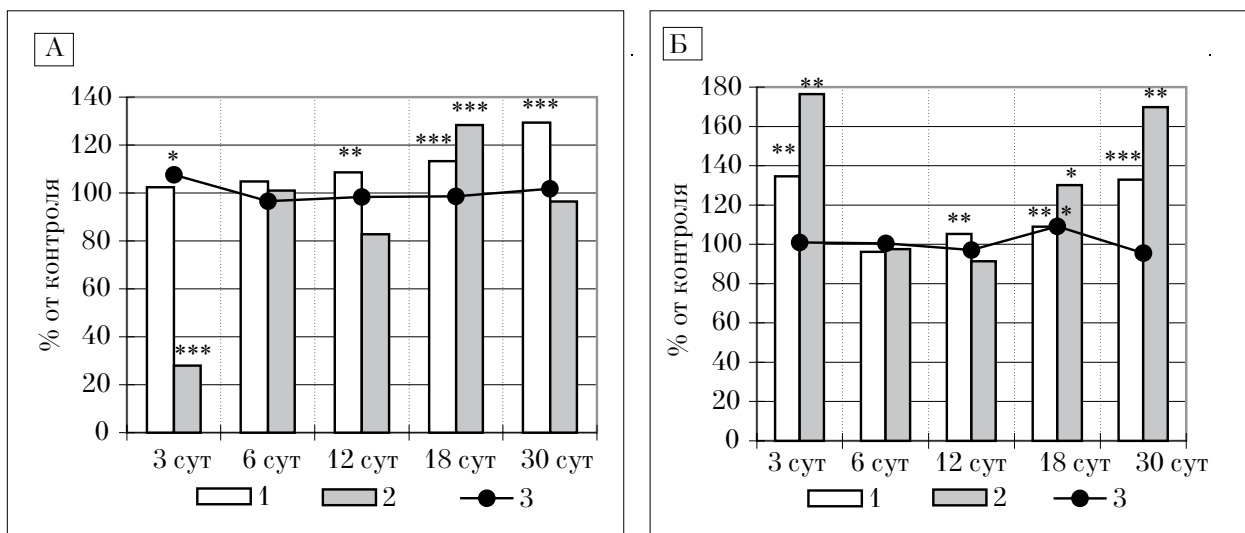
ОМБ приводит не только к продуктам окисления белков, но и к различным стабильным метаболитам аминокислот и пептидов, которые в свою очередь вызывают структурные перестройки белковых молекул [19]. Таковы-

Таблица

Биохимические показатели окислительной модификации белков и антиоксидантной системы в крови мышей контрольных групп\* (медиана, 25-й и 75-й процентиля)

Изучаемый показатель	Контроль (n=10), 3 суток	Контроль (n=20)**, 6–30 суток
Общий белок, г/л	56,3 (53,5÷58,4)	60,9 (60,1÷64,0)
Альдегиддинитрофенилгидразоны, е.о.п./г	206 (198÷225)	186 (178÷195)
Кетодинитрофенилгидразоны, е.о.п./г	22,6 (19,6÷25,3)	17,6 (14,0÷23,9)
Олигопептиды в плазме, г/л	0,177 (0,162÷0,203)	0,208 (0,184÷0,259)
Олигопептиды в эритроцитах, г/л	0,137 (0,118÷0,142)	0,109 (0,102÷0,118)
Вещества низкой и средней молекулярных масс в плазме, е.о.п.	6,87 (5,10÷6,99)	6,42 (5,14÷9,69)
Вещества низкой и средней молекулярных масс в эритроцитах, е.о.п.	9,03 (7,87÷9,84)	11,5 (9,87÷12,2)
Супероксиддисмутаза, мкмоль НСТ • эритроцитов/мин	91,8 (67,2÷108,5)	79,5 (71,0÷91,0)

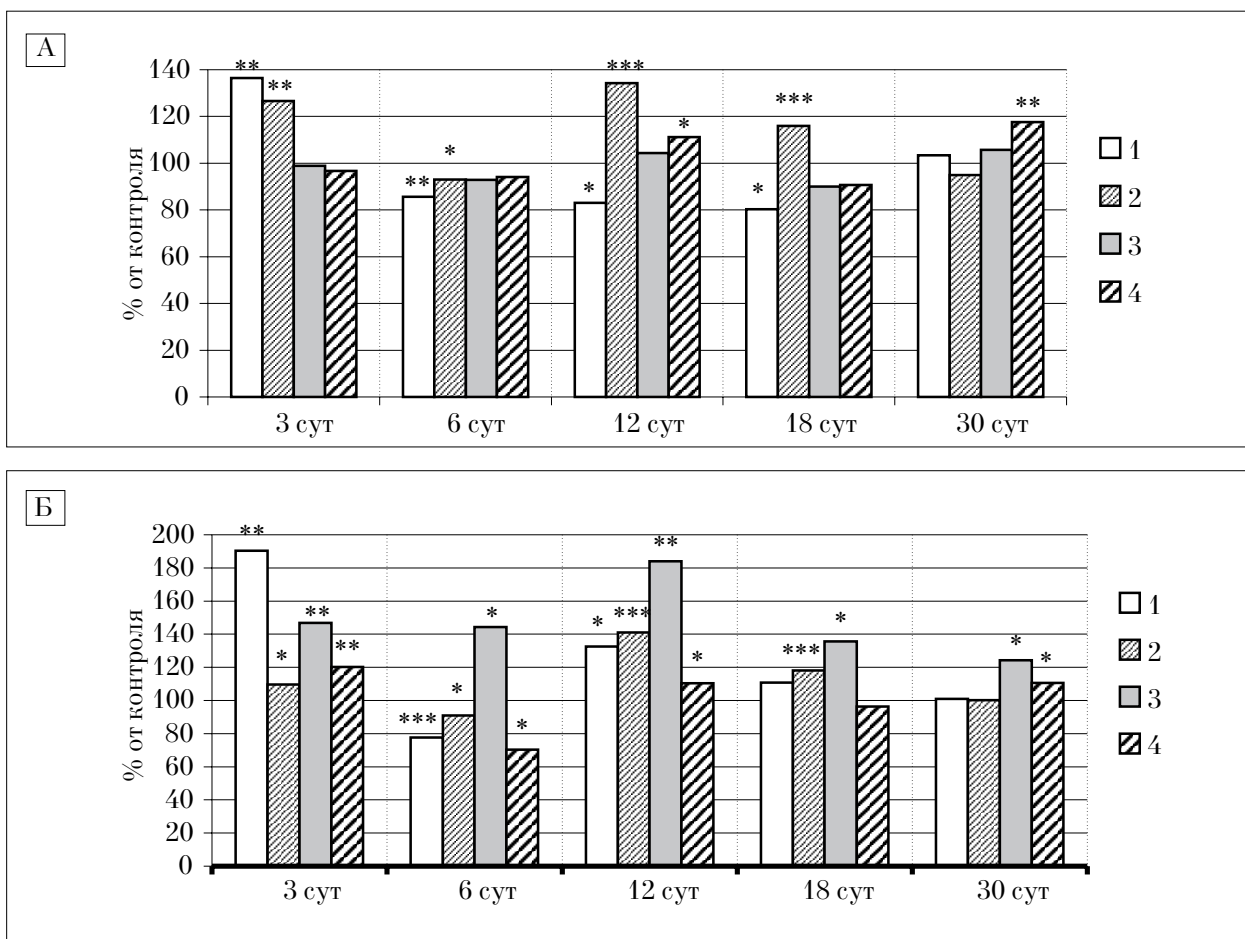
Примечания: \* – ввиду большого временного интервала между проведением исследований в 3-х и 30-и суточном экспериментах использовали свои контрольные группы; \*\* – для усреднения погрешностей текущего содержания животных, ввиду большого срока эксперимента, контрольная группа составляла 20 особей.



**Рис. 1.** Изменение содержания АФГ (1), КФГ (2) и ОБ (3)

в крови мышей после введения МФК высокой (А) и низкой (Б) дозы

Примечание: здесь и далее уровень значимости достоверных различий: \* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,005$ , \*\*\* –  $p < 0,0005$ ; контроль соответствует 100%.



**Рис. 2.** Изменение содержания ОП в плазме (1) и эритроцитах (2), ВНСММ в плазме (3) и эритроцитах (4) крови мышей после введения МФК высокой (А) и низкой (Б) дозы

ми являются олигопептиды и различной природы ВНСММ.

После введения МФК, независимо от уровня дозы ( $10^{-3}$  или  $10^{-15}$  мг/кг), через 3-е суток содержание ОП в плазме было в 1,4–1,9 раза выше контроля (рис. 2) и резко снижалось к 6-м суткам (особенно в плазме – в 1,5–2 раза). При этом после введения высоких доз МФК содержание ОП в плазме оставалось на 17–20% ниже нормы и через 12 и 18 суток при повышенном содержании ОП в эритроцитах. Такое распределение ОП между плазмой и эритроцитами, для которых характерны защитные функции, скорее всего, указывает на достаточную сорбционную ёмкость эритроцитов по отношению к эндотоксинам.

Данные об изменении содержания ОП в плазме и эритроцитах крови мышей опытных групп к 30 суткам после введения высоких и низких доз МФК позволили сделать вывод о нормализации процессов образования ОП: содержание ОП в плазме и эритроцитарной массе не отличалось от нормальных значений крови мышей контрольных групп (рис. 2).

На протекание адаптивных процессов в организме мышей опытных групп, приводивших к нормализации основных биохимических показателей, указывали и другие маркеры эндогенной интоксикации – ВНСММ в плазме и эритроцитах. После введения МФК в дозе  $10^{-3}$  мг/кг уровень ВНСММ в плазме и эритроцитах незначительно отличался от нормальных значений, а после введения МФК в дозе  $10^{-15}$  мг/кг изменения в содержании ВНСММ в плазме были особенно значительны (повышены в 1,4–1,8 раза) на протяжении эксперимента до 18-х суток. Уровень катаболического пула ВНСММ плазмы, значительно (в 1,5–3,5 раза) повышенный через 3-е суток после введения МФК, к 6-м суткам при введении низких доз МФК и к 12-м суткам при введении высоких доз МФК вернулся к норме, а к концу месячного срока эксперимента даже уменьшился. Достоверное повышение содержания ВНСММ в эритроцитах крови мышей при отсутствии отличий в плазме через 30 суток после введения МФК как в высокой, так и низкой дозах может свидетельствовать о нарушении процессов десорбции эндотоксинов эритроцитами в печени.

Изменение активности СОД в сроки эксперимента от 3-х до 30-и суток не всегда коррелировало с изменением содержания в крови опытных групп мышей продуктов ПОБ и маркеров эндогенной интоксикации. Так, после введения мышам высокой дозы МФК

через 3-е суток повышенная активность СОД, участвующей в утилизации супероксидного анион-радикала кислорода, соответствовала норме альдегидпроизводных и пониженному уровню кетопроизводных белковых молекул; через 18 суток содержание продуктов ПОБ было достоверно увеличено даже при повышенной активности СОД; через 30 суток концентрация АФГ (раннего маркера ОМБ) оставалась повышенной на 30% при минимизировании отличий в содержании других маркеров ЭИ в крови опытных и контрольных групп животных.

После введения МФК в низкой дозе через 6, 12 и 18 суток при повышенной активности СОД в среднем на 30% процессы перекисного окисления белков протекали без особенностей (уровни АФГ и КФГ мало отличались от контрольных значений) (рис. 3).

Через 3-е и 30 суток после инъекции раствора МФК в дозе  $10^{-15}$  мг/кг концентрации АФГ и КФГ в плазме крови мышей увеличивались значительно и практически одинаково – в 1,3 (АФГ) и 1,7 раза (КФГ). Такой рост продуктов ПОБ через 30 суток после введения МФК может свидетельствовать о срыве адаптивных механизмов, обеспечивающих работу АОС.

Таким образом, результаты выполненной работы показали, что разовое подкожное введение самцам лабораторных мышей такого специфического поллютанта как МФК, провоцирующего в организме состояние окислительного стресса, сопровождалось активацией перекисного окисления белков, содержание продуктов которого было повышено даже через 30 суток после введения МФК. Причём глубина изменений биохимических показателей ПОБ более выражена при введении МФК

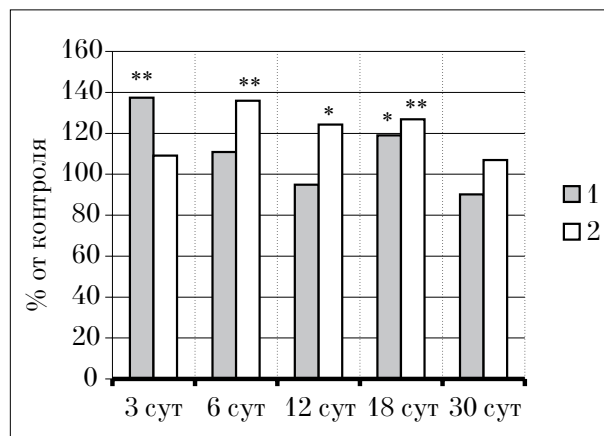


Рис. 3. Изменение активности СОД в плазме крови мышей после введения МФК в высокой (1) и низкой (2) дозах



в низкой дозе  $10^{-15}$  мг/кг массы животного. Однако в то же время наблюдалась нормализация маркеров эндогенной интоксикации и активности СОД, свидетельствующая о возможности восстановления резервно-адаптационных возможностей организма лабораторных мышей.

На основании полученных результатов для дальнейшего изучения в качестве биомаркеров присутствия фосфорорганических соединений типа метилфосфонатов в природных средах можно рекомендовать продукты ПОБ, ОП и ВНСММ в плазме и эритроцитах, наряду с активностью СОД, как наиболее информативные показатели.

### Литература

1. Каган Ю.С. Токсикология фосфорорганических пестицидов. М.: Медицина, 1977. 293 с.
2. Kafarski P., Leiczak B., Mastalerz P. Phosphonopeptides – synthesis and biological activity // Beitr. Wirkstofforsch. 1985. Н. 25. Р. 3–77.
3. Нифантьев Э. Е. Химия гидрофосфорильных соединений. М.: Наука, 1983. 263 с.
4. Пурдела Д., Вылчану Р. Химия органических соединений фосфора. М.: Химия, 1972. 752 с.
5. 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. V. 107. № 12. Р. 933–974.
6. Ефременко Е.Н., Завьялова Н.В., Гудков Д.А., Лягин И.В., Сенько О.В., Гладченко М.А., Сироткина М.С., Холстов А.В., Варфоломеев С.Д., Холстов В.И. Экологически безопасная биодеградация реакционных масс, образующихся при уничтожении фосфорорганических отравляющих веществ // Рос. хим. ж. 2010. Т. LIV. № 4. С. 19–24.
7. Кононова С.В., Несмеянова М.А. Фосфонаты и их деградация микроорганизмами // Биохимия. 2002. Т. 67. № 2. С. 220–233.
8. Огородникова С.Ю., Головки Т.К., Ашихмина Т.Я. Реакции растений на действие метилфосфоновой кислоты // Теоретическая и прикладная экология. 2007. № 1. С. 78–93.

9. Серебрякова Н.Н. Влияние ксенобиотиков на физиологию и биохимию листостебельных мхов // Вестник Оренбургского государственного университета. Оренбург, 2007. № 12. С. 71–75.

10. Плотникова О.М., Матвеев Н.Н., Корепин А.М., Дуплякина И.В. Биохимические показатели лабораторных мышей в зависимости от времени интоксикации метилфосфонатом // Теоретическая и прикладная экология. 2010. № 1. С. 81–86.

11. 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 // Вестник Челябинского государственного педагогического университета. – Челябинск: Изд-во ЧГПУ, 2011. № 1. С. 307–316.

12. Международные рекомендации по проведению медико-биологических исследований с использованием животных // Ланималогия. 1993. № 1. С. 29.

13. Правила лабораторной практики в Российской Федерации: приложение к приказу МЗ РФ № 267 от 19.06.2003.

14. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика, 1998. 459 с.

15. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике. М.: МЕДпресс-информ, 2004. 920 с.

16. Методика выполнения измерений биохимических показателей в плазме (сыворотке) крови мелких теплокровных животных фотометрическим методом. Свидетельство об аттестации МВИ № 22.11.03.052/2009.

17. Малахова М.Я. Методы биохимической регистрации эндогенной интоксикации. Сообщение второе // Эфферентная терапия. 1995. Т. 1. № 2. С. 61–64.

18. Вьюшина А.В., Вайдо И.А., Герасимова И.Г., Ширяева Н.П., Флеров М.А. Различия в процессах перекисного окисления белков у крыс, селективированных по порогу возбудимости нервной системы // Бюл. эксп. биол. 2002. Т. 133. № 3. С. 292–296.

19. Губский Ю.И., Беленичев И.Ф., Левицкий Е.Л., Коваленко С.И., Павлов С.В., Ганчева О.В., Марченко А.Н. Токсикологические последствия окислительной модификации белков при различных патологических состояниях (обзор литературы) // Совр. пробл. токсикол. 2005. № 3. С. 20–26.