

**О возможности использования ферментативных методов  
для диагностики влияния метилфосфонатов и моноэтаноламина  
на теплокровных животных в районах расположения объектов  
уничтожения химического оружия**

© 2013. О. М. Плотникова<sup>1,2</sup>, д.б.н., научный руководитель,  
А. Н. Евдокимов<sup>1</sup>, н.с., М. А. Григорович<sup>1</sup>, к.б.н., зав. лабораторией,  
<sup>1</sup>Региональный центр по обеспечению государственного экологического  
контроля и мониторинга объектов по хранению и уничтожению  
химического оружия по Курганской области,  
<sup>2</sup>Курганский государственный университет,  
e-mail: kurgan-rc@yandex.ru, plotnikom@yandex.ru

Показано, что метилфосфоновая кислота (МФК) и моноэтаноламин (МЭА) в невысоких дозах могут вызывать длительное (до 8–12 суток), но обратимое воздействие на организм теплокровных животных, вызывая изменение активности ферментов – маркеров состояния печени. Одноразовое внутримышечное введение МФК или МЭА снижают до 20–40% активность аминотрансфераз и холинэстеразы. При хроническом воздействии на мышей МФК или МЭА в течение трёх месяцев происходит достоверное увеличение активности аланинаминотрансферазы и снижение – холинэстеразы, что указывает на возможность использования этих показателей для мониторинга состояния теплокровных организмов. Полученные данные указывают на необходимость соблюдения экологической безопасности и проведение мониторинга на территориях санитарно-защитных зон объектов уничтожения фосфорорганических отравляющих веществ.

It is shown that methylphosphonic acid (MPA) and monoethanolamine (MEA) in low doses can have long-term (8–12 days), but reversible effects on the body of warm-blooded animals, causing a change in the activity of enzymes – markers of the liver. Single intramuscular injection of MPA or MEA reduced transaminases and cholinesterase to 20–40%. At chronic impact of MPA or MEA on mice within three months there is a reliable increase in activity of alanineaminotransferase and decrease in cholinesterase that points to possibility of using these indicators for monitoring of a condition of warm-blooded organisms. The obtained data indicate the need of observance of ecological safety and monitoring in territories of sanitary protection zones of objects of destruction of organophosphorus poison gases.

**Ключевые слова:** метилфосфоновая кислота, моноэтаноламин, аминотрансферазы, холинэстераза, лабораторные мыши

**Keywords:** methylphosphonic acid, monoethanolamine, transaminases, cholinesterase, laboratory mice

ФЦП «Уничтожение запасов химического оружия в Российской Федерации» ([1]) при хранении и уничтожении химического оружия обязывает обеспечивать экологическую безопасность на объектах по уничтожению химического оружия и территориях санитарно-защитных зон (СЗЗ), для чего разрабатываются новые современные и доступные методы биологического мониторинга.

В состав отходов после уничтожения фосфорорганических отравляющих веществ (ФОВ) входят такие специфические вещества, как метилфосфоновая кислота (МФК) как конечный и достаточно устойчивый продукт детоксикации ФОВ и моноэтаноламин – основной компонент гидролизующей смеси. Воздействие отхода на организм оценивается по статисти-

чески достоверным изменениям показателей функционального состояния организма – гематологическим, биохимическим, иммунологическим [2].

Необходимость оценки загрязнения природных сред и объектов экспериментальными методами по изменению гематологических и биохимических показателей доказана исследованиями, показавшими, что малые дозы некоторых веществ, например МФК, могут оказывать влияние на гомеостаз теплокровных животных, вызывая окислительную модификацию белков, изменения энергетического обмена и активности ферментов [3–5].

В детоксикации ксенобиотиков, попадающих в организм животных, основную роль играет печень, изменение функционального

состояния которой можно характеризовать по изменению активности важнейших ферментов – аминотрансфераз и холинэстеразы.

В настоящей работе было исследовано изменение активности холинэстеразы, аланин- и аспаргатаминотрансфераз у лабораторных мышей линии СВА в долговременном эксперименте после однократного введения растворов метилфосфоновой кислоты и моноэтаноламина и в хроническом эксперименте после еженедельного введения этих же токсикантов.

### Объекты и методы исследования

Исследования проводили на лабораторных мышах (260 особей самцов) линии СВА в возрасте 2–3-х месяцев массой  $25 \pm 3$  г, которые содержались в стандартных условиях аттестованного вивария. Животным опытных групп внутримышечно вводили в объёме 0,1 мл нейтрализованные изотонические растворы моноэтаноламина (МЭА) или МФК в виде метилфосфоната натрия в дозах 1 и 5 мг/кг массы животного соответственно. Кроме того, было проведено исследование хронического влияния МФК в низкой дозе – 10–15 мг/кг. Животным контрольных групп вводили физраствор в том же объёме.

У животных для исследования брали цельную кровь, из которой после центрифугирования получали гепаринизированную плазму, взятую через 1–16 суток после однократного введения растворов МФК или МЭА (долговременный эксперимент) и через 3 месяца после еженедельного введения растворов МФК или МЭА (хронический эксперимент).

Все работы с лабораторными мышами проводили в соответствии с международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных [6], правилами лабораторной практики и проведения работ с использованием экспериментальных животных в Российской Федерации [7].

Совокупности полученных экспериментальных данных в каждой выборке обрабатывались используемыми в биологии и медицине методами непараметрической статистики [8]. Результаты исследования представляли в виде медианы, на основании которой считали различия значений в процентах (%) в опытных группах относительно контрольных. 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 принимали менее 0,05.

Активность ферментов в плазме крови определяли кинетическим фотометрическим методом на биохимическом анализаторе StatFax 3300 (наборные методы «ВекторБест», г. Новосибирск). Метод измерения активности холинэстеразы (ХЭ) основан на свойстве фермента гидролизовать бутирилтиохолин с образованием масляной кислоты и тиохолина, который восстанавливает окрашенный гексацаноферрат (III) – скорость снижения оптической плотности раствора ( $\lambda=405$  нм) пропорциональна активности ХЭ. При определении активности аспаргата- (АСТ) и аланин- (АЛТ) аминотрансфераз использованы свойства L-аспартата и L-аланина взаимодействовать с  $\alpha$ -кетоглутаратом с образованием L-глутамата и оксалоацетата или пирувата, которые восстанавливаются соответственно до яблочной (в присутствии малатдегидрогеназы) или молочной (в присутствии лактатдегидрогеназы) кислот в реакции с НАДН – скорость изменения оптической плотности растворов при  $\lambda=320$  нм прямо пропорциональна активности АСТ или АЛТ.

### Результаты эксперимента

При анализе экспериментальных данных изменения биохимических показателей крови лабораторных мышей в опытных группах рассматривали относительно контрольных. В таблицах 1 и 2 приведены полученные результаты измерения активности ферментов для мышей контрольных групп в экспериментальных сериях при изучении влияния МФК в дозе 5 мг/кг и МЭА в дозе 1 мг/кг после разового внутримышечного введения.

В результате исследований было выявлено, что после внутримышечного введения МФК в дозе 5 мг/кг активность изученных ферментов в плазме крови самцов изменялась волнообразно (рис. 1). При этом во времени наиболее чётко проявились максимумы и минимумы активности после введения МФК для холинэстеразы и аланинаминотрансферазы: максимумы активности отмечены через 2 и 5 суток, а минимумы – через 3–4 и 8 суток после внутримышечного введения МФК мышам. Аналогичные бимодальные закономерности были обнаружены для изменения некоторых субстратов крови мышей [3, 5]. В литературе неспецифическую особенность

Таблица 1

Активность ферментов – маркеров состояния печени в крови мышей контрольных групп\* (медиана, 25-й и 75-й процентиля) в экспериментальной серии при изучении влияния МФК после однократного внутримышечного введения

| Изучаемый показатель                   | 1, 2, 3, 4, 5 суток<br>n=24 | 8, 12, 16 суток<br>n=24 | 3 месяца<br>n=12  |
|--|-----------------------------|-------------------------|-------------------|
| Аланинаминотрансфераза (АЛТ), мккат/л  | 0,86<br>0,56÷1,21           | 0,89<br>0,64÷0,92       | 0,73<br>0,63÷0,82 |
| Аспаратаминотрансфераза (АСТ), мккат/л | 4,71<br>4,37÷5,09           | 3,50<br>3,25÷3,93       | 2,88<br>2,71÷3,55 |
| Холинэстераза (ХЭ), мккат/л            | 84<br>80÷88                 | 97<br>75÷112            | 47<br>44÷49       |

Примечание: \* – ввиду большого временного интервала между проведением исследований – 1-5, 8-16 суток и 3 месяца – в экспериментах использовали свои контрольные группы, где n – число особей в контрольных группах.

Таблица 2

Активность ферментов – маркеров состояния печени в крови мышей контрольных групп\* (медиана, 25-й и 75-й процентиля) в экспериментальной серии при изучении влияния МЭА после однократного внутримышечного введения

| Изучаемый показатель                   | 1-5 суток<br>n=24 | 8 суток<br>n=8    | 12 суток<br>n=8   | 16 суток<br>n=8   | 3 месяца<br>n=12  |
|--|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Аланинаминотрансфераза (АЛТ), мккат/л  | 1,14<br>0,92÷1,25 | 1,41<br>1,00÷2,03 | 0,96<br>0,57÷0,98 | 0,66<br>0,63÷0,98 | 0,53<br>0,50÷0,61 |
| Аспаратаминотрансфераза (АСТ), мккат/л | 4,47<br>4,18÷4,76 | 5,35<br>4,08÷5,78 | 4,47<br>4,22÷4,77 | 3,78<br>3,77÷4,12 | 3,88<br>3,60÷4,23 |
| Холинэстераза (ХЭ), мккат/л            | 113<br>98÷121     | 78<br>66÷88       | 86<br>70÷90       | 63<br>60÷75       | 90,0<br>88,8÷98,7 |

Примечание: см. таблицу 1.

для стрессорных факторов называют «законом волнообразности адаптационного процесса» [9, 10].

Под влиянием другого специфического вещества – моноэтанолamina активность изученных аминотрансфераз и холинэстеразы оставалась пониженной на 20–40% от контроля через 2–5 суток после введения МЭА в дозе 1 мг/кг массы животного (рис. 2).

Активность изученных ферментов, характеризующих функции печени, восстанавливалась до контрольных значений после однократного введения МФК или МЭА только к 16 сут.

После обнаружения такой особенности – влиять на активность важнейших ферментов даже через 8–12 сут. после однократного введения таких незначительных доз МФК и МЭА, как 5 и 1 мг/кг на массу животного соответственно, был выполнен хронический эксперимент с еженедельным введением указанных доз токсикантов в течение 3-х месяцев (рис. 3).

При хроническом влиянии МФК на организм мышей достоверно повышалась в 1,5 раза активность АЛТ лишь при тенденции к повышению активности АСТ и холинэстеразы. Ин-

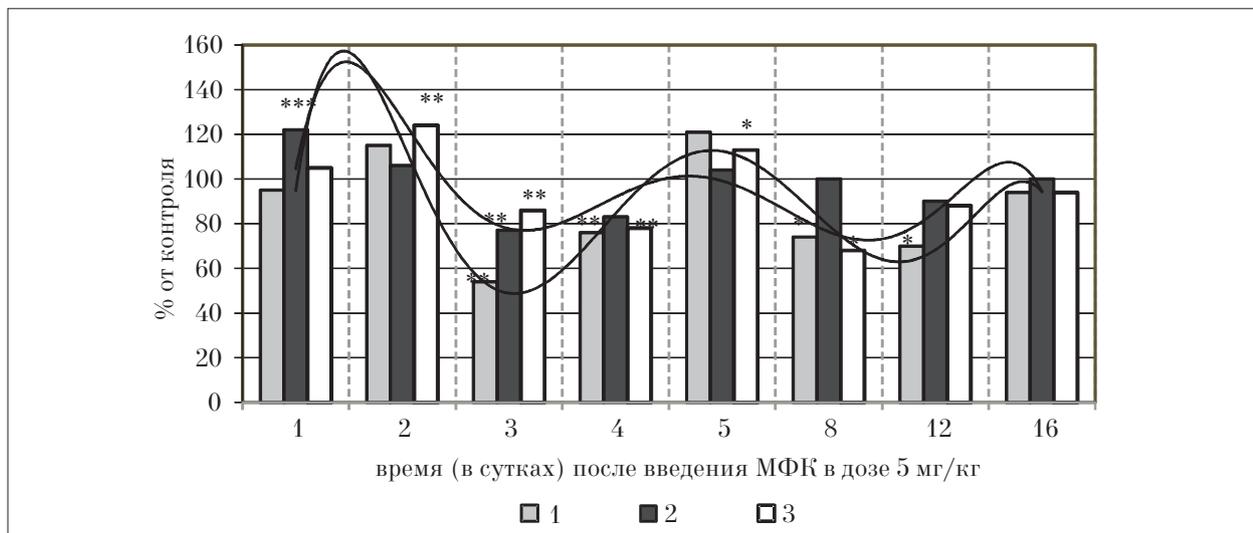
тегральный коэффициент де Ритиса АСТ/АЛТ при этом уменьшался в 1,3 раза по сравнению с контролем, что может происходить при функциональных нарушениях печени.

При хроническом влиянии МЭА достоверно понижалась в 1,3 раза активность холинэстеразы при тенденции к повышению активности аминотрансфераз АСТ и АЛТ.

Активность ферментов является одним из самых чувствительных показателей у живых организмов и всё чаще используется при экологических и медицинских тестированиях. Так, мониторинг активности сывороточной холинэстеразы обязателен для людей, работающих с фосфорорганическими соединениями. Поэтому хронический эксперимент был выполнен для МФК в дозе  $10^{-15}$  мг/кг.

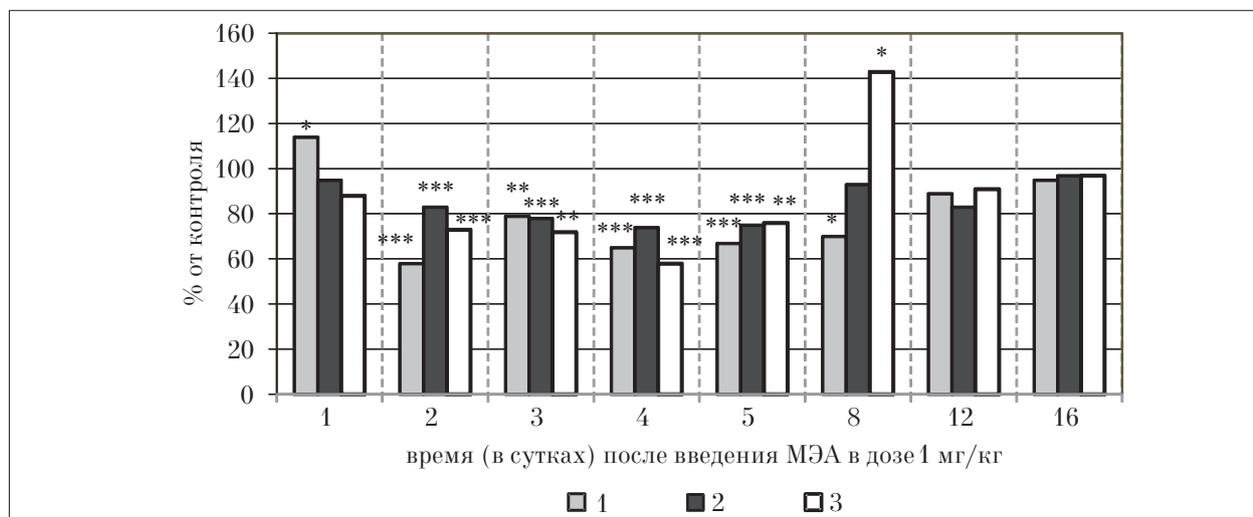
В результате было выявлено, что еженедельное, в течение трёх месяцев, внутримышечное введение самцам МФК в дозе  $10^{-15}$  мг/кг приводило к достоверному увеличению активности АСТ 1,3 раза и холинэстеразы в 1,7 раза (рис. 4).

Повышение активности важнейших ферментов, характеризующих белковообразующую функцию печени, может быть связано

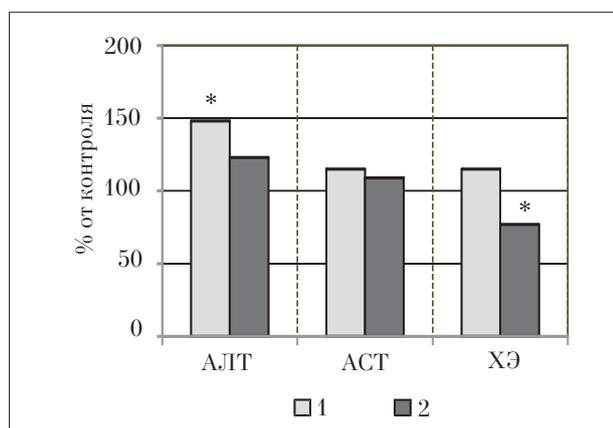


**Рис. 1.** Изменение активности аланин-(1), аспартат-(2) аминотрансфераз и холинэстеразы (3) у лабораторных мышей после однократного введения МФК.

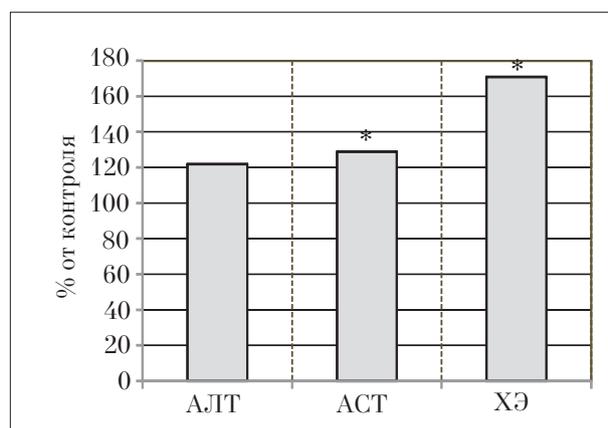
Примечание: здесь и далее уровень значимости достоверных различий: \* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,005$ , \*\*\* –  $p < 0,0005$ ; контроль соответствует 100%.



**Рис. 2.** Изменение активности аланин-(1), аспартат-(2) аминотрансфераз и холинэстеразы (3) у лабораторных мышей после однократного введения МЭА. Примечание: см. рис. 1.



**Рис. 3.** Изменение активности аланин-, аспаратаминотрансфераз и холинэстеразы у лабораторных мышей через 90 суток после еженедельного введения МФК (1) в дозе 5 мг/кг или МЭА (2) в дозе 1 мг/кг. Примечание см. рис. 1.



**Рис. 4.** Изменение активности аланин-, аспаратаминотрансфераз и холинэстеразы у лабораторных мышей через 90 суток после еженедельного введения МФК в дозе  $10^{-15}$  мг/кг. Примечание: см. рис. 1.

с необходимостью синтеза белков (прежде всего альбумина) из-за их повышенного распада по пути окислительной модификации под действием МФК, способной активировать радикальные процессы или быть «ловушкой» радикалов в зависимости от воздействующей дозы [11]. Снижение активности холинэстеразы при хроническом влиянии моноэтаноламина связано, скорее всего, с нарушением функций печени из-за её повреждения этим токсикантом.

Таким образом, эти данные позволили нам утверждать, что самцы в достаточной мере подвержены влиянию МФК, особенно в низкой дозе, которое направлено в основном на белковые молекулы, что сопровождается повышением активности холинэстеразы для восполнения модифицированных белков. Особенностью влияния низких доз МФК является, по-видимому, регуляторный механизм действия МФК, который осуществляется через локализованные в биологических мембранах регуляторные системы путём специфического связывания с рецепторами; он опосредован, скорее всего, образующимися наноассоциатами (согласно работам А.И. Коновалова и сотрудников, ИОФХ РАН им. А. Е. Арбузова [12]).

В целом результаты исследования по изучению активности ферментов – маркеров состояния печени показали, что такие специфические вещества, как метилфосфоновая кислота и моноэтаноламин, в невысоких дозах могут:

- вызывать длительное (до 8–12 суток), но обратимое воздействие на организм теплокровных животных, приводя после разового воздействия к снижению активности аминотрансфераз и холинэстеразы;
- нарушать функции печени при хроническом воздействии.

Таким образом, нами предложен нетрадиционный подход к возможности использования биохимических показателей метаболизма в качестве индикаторов влияния метилфосфонатов в концентрациях, не определяемых доступными методами экоаналитического контроля.

Эти данные указывают на необходимость ответственного отношения к вопросам санации территорий санитарно-защитных зон объектов уничтожения фосфорорганических отравляющих веществ.

## Литература

1. Федеральная целевая программа «Уничтожение запасов химического оружия в Российской Федерации». Постановление Правительства Российской Федерации от 21.03.1996 г. №305 (в ред. Постановление Правительства РФ от 09.2012 г. № 1005).
2. Санитарные правила по определению класса опасности токсичных отходов производства и потребления. СП 2.1.7.1386-03. Пост. Минздрава РФ № 144 от 16.06.2003 г.
3. Плотникова О.М., Корепин А.М., Матвеев Н.Н., Лунева С.Н. Биохимические показатели крови в оценке влияния метилфосфоната на лабораторных мышей в долговременном эксперименте // Теоретическая и прикладная экология. 2011. № 3. С. 65–70.
4. Плотникова О.М., Матвеев Н.Н., Савинова И.В., Корепин А.М., Лунева С.Н. Оценка влияния низких доз метилфосфоната на теплокровных животных по биохимическим показателям крови мышей // Естественные и технические науки. 2011. № 1 (51). С. 32–37.
5. Плотникова О.М., Корепин А.М., Матвеев Н.Н., Лунева С.Н. Маркеры эндогенной интоксикации в крови лабораторных мышей при интоксикации различными дозами метилфосфоната // Вестник Челябинского гос. педагогического ун-та. 2011. № 2. С. 346–353.
6. Международные рекомендации по проведению медико-биологических исследований с использованием животных // Ланималогия. 1993. № 1. С. 29.
7. Правила лабораторной практики в Российской Федерации: приложение к приказу МЗ РФ № 267 от 19.06.2003. Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных: приложение к приказу МЗ СССР № 755 от 12.03.1977.
8. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика, 1998. 459 с.
9. Степанова С.И. Биоритмические аспекты проблемы адаптации. М.: Наука, 1986. 244 с.
10. Судаков В.К. Новые акценты классической концепции стресса // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1997. № 2. С. 124–130.
11. Плотникова О.М. Влияние метилфосфоновой кислоты на основные звенья гомеостаза белых лабораторных мышей: автореф. дис. ... докт. биол. наук. Казань, 2012. 44 с.
12. Рыжкина И.С., Киселева Ю.В., Муртазина Л.И., Пальмина Н.П., Белов В.В., Мальцева Е.Л., Шерман Е.Д., Тимошева А.П., Коновалов А.И.. Влияние концентрации  $\alpha$ -токоферола на самоорганизацию, физико-химические свойства растворов и структуру биологических мембран // Доклады Академии наук. 2011. Т. 438. № 5. С. 635–639.