

УДК 577.151.45

Мышиная модель для оценки субхронической токсичности фосфорорганических пестицидов

В. А. Паликов¹, С. С. Терехов², Ю. А. Паликова¹, О. Н. Хохлова¹, В. А. Казаков¹,
И. А. Дьяченко¹, С. В. Пантелеев², Ю. А. Мокрушина², В. Д. Кнорре^{2*}, О. Г. Шамборант²,
И. В. Смирнов^{2,3}, А. Г. Габибов²

¹Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 142290, Московская обл., Пущино, просп. Науки, 6

²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

³Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3

*E-mail: vera.knorre@gmail.com

Поступило в редакцию 06.12.2017

Принято к печати 10.12.2018

РЕФЕРАТ Создание антидотов к фосфорорганическим ядам – важная задача современной фармакологии. Рекомбинантные ацетилхолинэстераза и бутирилхолинэстераза (БуХЭ) являются эффективными акцепторами фосфорорганических ядов, в том числе пестицидов. Представлены результаты определения эффективности рекомбинантной бутирилхолинэстеразы при моделировании фосфорорганического отравления, вызванного пероральным введением параоксона в дозе 2 мг/кг. Показана высокая активность БуХЭ как протективного средства при субхроническом антихолинэстеразном отравлении на модели *in vivo*. Использование БуХЭ в дозе 20 мг/кг помогло избежать гибели модельных животных, а также способствовало их быстрому восстановлению после отравления.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА биоловушка, бутирилхолинэстераза, *in vivo* модели, фосфорорганические соединения.

ВВЕДЕНИЕ

Современная терапия острых и тяжелых хронических отравлений фосфорорганическими соединениями (ФОС) включает в себя реанимацию пациентов, проведение искусственной вентиляции легких, терапию мускариновым антагонистом (обычно атропином) в комбинации с введением большого количества жидкости и реактиватора ацетилхолинэстеразы, например пралидоксима [1]. Однако такая терапия зачастую вызывает тяжелые побочные эффекты: тошноту, рвоту, частичную или полную потерю трудоспособности, что связано с невозможностью исключить вероятность необратимого повреждения нейронов.

Одним из перспективных подходов в терапии отравлений ФОС является использование биологических антидотов – биомолекул, связывающих и инактивирующих ФОС [2–5]. В качестве таких антидотов рассматриваются такие ферменты, как бутирилхолинэстераза человека (чБуХЭ) и антитела, способные связываться или гидролизовать ФОС [6, 7]. чБуХЭ – естественный биологический антидот (суицидальный

инактиватор) при отравлении ФОС. Благодаря уникальному сходству с ацетилхолинэстеразой человека (чАцХЭ) и большому объему полости активного центра чБуХЭ инактивирует широчайший спектр ФОС, причем зачастую эффективнее чАцХЭ [8]. Более того, использование чБуХЭ позволяет избежать долговременных побочных эффектов отравления ФОС, включая и необратимое повреждение мозга [9].

Фосфорорганические соединения представляют собой самую большую группу химических пестицидов, применяемых для защиты растений. Поскольку потребители едят свежие фрукты и овощи, то они автоматически попадают в группу повышенного риска отравления пестицидами. Параоксон – активный метаболит пестицида паратион, считается одним из наиболее мощных препаратов, ингибирующих чАцХЭ [10]. Основным способом попадания инсектицидов, подобных параоксону, в организм является контакт с кожными покровами или поступление через желудочно-кишечный тракт [11], что приводит к острому или хроническому отравлению человека и животных. Кроме того, большин-

ство инсектицидов на основе ФОС являются липофильными соединениями, склонными к накоплению в жировых тканях, что значительно увеличивает потенциал их хронического воздействия на организм человека. Таким образом, разработка моделей *in vivo*, позволяющих оценивать субхроническую токсичность фосфорорганических пестицидов, представляет существенный интерес, так как позволяет определять долговременные эффекты воздействия ФОС на физиологические и поведенческие характеристики животного.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Токсичность препарата рчБуХЭ изучали на 36 мышах BALB/c (три группы – две опытные и одна контрольная) по шесть самцов и шесть самок в каждой. Формирование таких групп позволяет получить репрезентативную выборку и статистически значимые данные. До начала исследования группы животных в клетках помещали в отдельную комнату на 7 дней для адаптации. В течение этого периода у животных контролировали появление признаков отклонения в состоянии здоровья. В эксперимент случайным образом отбирали здоровых животных, у которых индивидуальное значение массы не отклонялось от среднего значения в пределах пола более чем на 10%. Основные правила содержания и ухода за животными соответствовали нормативам, указанным в руководстве Guide for Care and Use of Laboratory Animals. (ILAR publication, 1996, National Academy Press).

Тестируемой группе животных подкожно вводили ингибитор карбоксилэстераз крезилбензодиоксафосфориноксид (CBDP) в дозе 1.5 мг/кг. Через 15 мин мыши внутривенно получали рчБуХЭ в дозе 20 мг/кг (или физраствор), после чего перорально вводили параоксон в дозе 2 мг/кг. Введение веществ происходило на 1, 3, 5 дни исследования. Комплексное тестирование проводили после третьего введения на 6-й день исследования. Массу тела животных, потребление корма и воды регистрировали ежедневно. Для оценки эффективности действия антидота проводили функциональные тесты, такие, как регистрация силы, параметров дыхания, локомоторной и исследовательской активности животных.

Регистрация параметров дыхания

Состояние дыхательной системы оценивали с использованием компьютерной системы PowerLab 8/35. В данном тесте оценивали такие параметры, как частота дыхания (раз/мин), дыхательный объем (мл), максимальный поток выдоха (мл/с). Тестирование проводили на 6-й день исследования (после третьего введения веществ).

Регистрация локомоторной и исследовательской активности

Общую локомоторную и исследовательскую активность регистрировали при комплексном тестировании животных после клинического осмотра. Поведенческую активность анализировали в тесте «открытое поле» на многофункциональной системе TSE Multi Conditioning System Extended Advanced. Тест проводили на 6-й день исследования (после третьего введения веществ). Продолжительность теста 3 мин. При нахождении животного на открытой площадке актометра регистрировали пройденное животным расстояние (см), время неподвижности (с) и количество стоек на задних лапах.

Регистрация мышечной силы, отражающая работу периферических нервов в тесте хватания Grip Strength

Мышечную силу животного измеряли с помощью прибора GRIP STRENGTH METER, Columbus Instruments. Регистрировали силу натяжения пластины динамометра прибора передними лапами животного (в кг). Измерения выполняли при комплексном тестировании животного (после процедуры регистрации локомоторной активности) на 6-й день исследования (после третьего введения веществ). Для всех количественных данных, полученных в ходе исследований, применяли описательную статистику. Для установления межгрупповых различий и сравнения экспериментальных групп с контрольной использовали однофакторный дисперсионный анализ Крускала–Уоллеса и/или тест Манна–Уитни. Статистический анализ проводили с помощью программы Statistica for Windows 7.1. При $P < 0.05$ различия считали статистически значимыми. Результаты представляли как значение \pm стандартная ошибка ($P \leq 0.0005$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для определения эффективности бутирилхолинэстеразы в качестве терапевтического агента, используемого для профилактики отравлений фосфорорганическими соединениями, разработана биомодель, в которой учитывается разница в «эстеразном статусе» мыши и человека. Содержание чБуХЭ в крови человека в 2 раза выше, чем в крови мыши (5 и 2.6 мг/л соответственно), тогда как АцХЭ в 25 раз меньше (0.008 и 0.2 мг/л соответственно). Кроме того, классические лабораторные животные (грызуны: мыши, крысы и морские свинки) обладают еще одним эволюционно значимым механизмом защиты от отравлений ФОС, связанным с наличием гена карбоксилэстеразы плазмы крови ES1, необратимо инактивирующей широкий спектр ФОС. В плазме

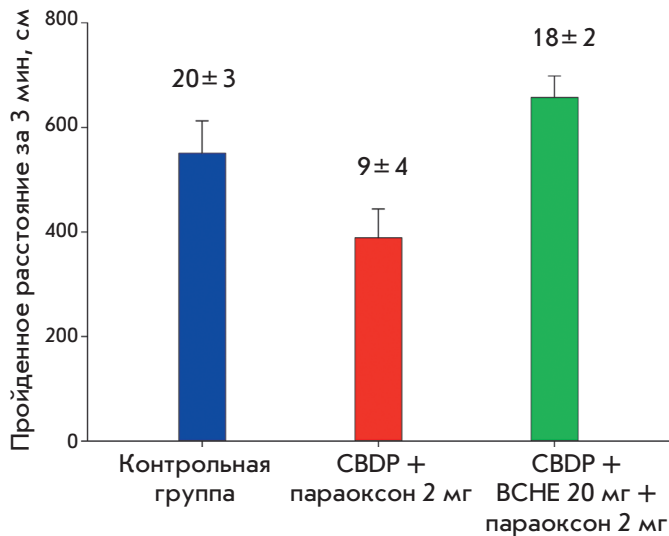


Рис. 1. Анализ локомоторной и исследовательской активности. Оценивали пройденное животным расстояние (см). Цифры над столбиками соответствуют количеству стоек на задних лапах. Планки погрешности иллюстрируют стандартное отклонение в группе

крови человека нет этого фермента, что приводит к ложной интерпретации данных при оценке токсичности ФОС. В плазме крови человека имеются две основные эстеразы – бутирилхолинэстераза (чБуХЭ, 5 мг/л) и PON1 (50 мг/л). Для того чтобы максимально снизить фоновую активность эндогенной карбоксилэстеразы плазмы крови у мышей, использовали специфический ингибитор крезилбензодиоксафосфоиноксид (CBDP) в дозе 1.5 мг/кг, который полностью подавлял активность данного фермента. CBDP вводили подкожно перед введением фосфорорганического агента. В качестве модельного ФОС был выбран параоксон, так как именно он и его аналоги являются естественными метаболитами подавляющего большинства фосфорорганических пестицидов, используемых в настоящее время. Для имитации хронического травления применяли пероральный способ введения препарата, имитирующий проникновение пестицида при употреблении продуктов питания.

Показано снижение локомоторной активности у мышей, получивших ФОС без терапии препаратом рчБуХЭ. Пройденное мышами расстояние изменилось в 1.5 раза, исследовательская активность снизилась более чем в 2 раза (рис. 1). Введение препарата рчБуХЭ, в свою очередь, полностью восстанавливало моторные функции и исследовательскую активность. Значительное снижение моторных функций и исследовательской активности в рамках нашей модели было ассоциировано со значительным подавлением активности дыхательного центра (рис. 2).

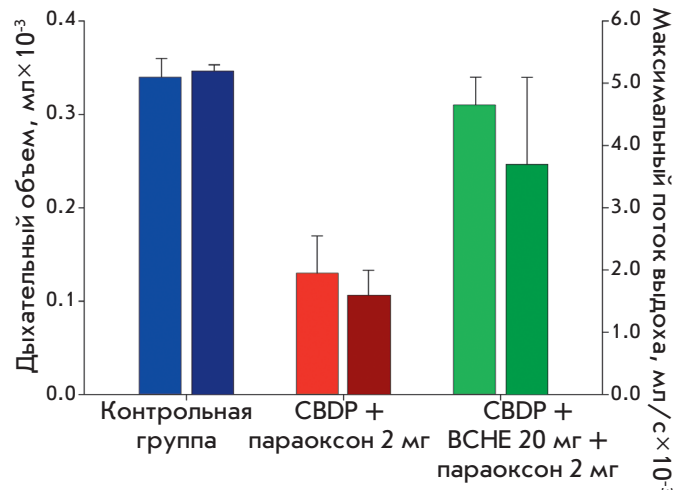


Рис. 2. Анализ параметров дыхания. Оценивали дыхательный объем (левые столбцы), а также максимальный поток выдоха (правые столбцы). Тестирование проводили на 6-й день исследования (после третьего введения веществ). Планки погрешности иллюстрируют стандартное отклонение в группе

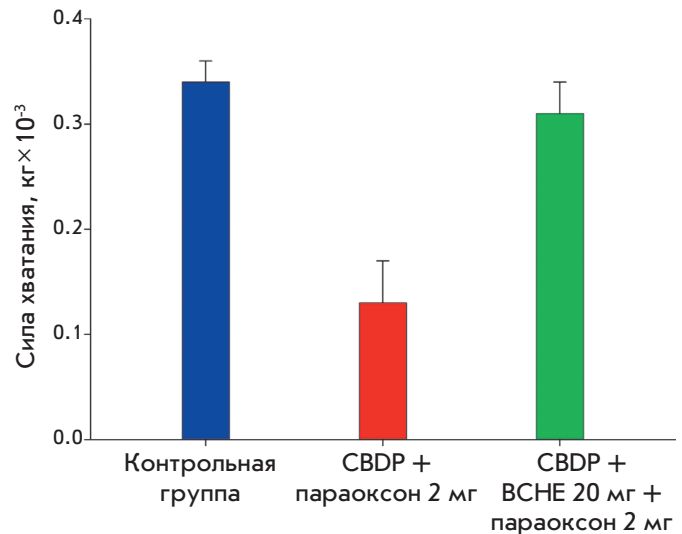


Рис. 3. Анализ мышечной силы в тесте хватания Grip Strength. Регистрировали силу натяжения пластины динамометра прибора передними лапами животного (кг). Планки погрешности иллюстрируют стандартное отклонение в группе

Основные характеристики функции дыхания, такие, как дыхательный объем и максимальный поток выдоха, в группе животных, получавших ФОС, были снижены в 3 раза по сравнению с контрольной группой. В то же время терапия препаратом рчБуХЭ восстанавливала полноценный дыхательный процесс. Сопоставимый эффект наблюдался при анализе силы хватания (рис. 3). Параоксон вызывал значи-

тельное снижение силы мускулатуры. Сила хватания в группе, находившейся под действием ФОС, была в 2.5 раза ниже, чем у животных контрольной группы. Аналогично эффектам, описанным ранее, терапия препаратом рчБуХЭ позволяла сохранить мышечную активность, отменяя физиологические проявления хронических эффектов воздействия параоксона.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, нами разработана биомодель, позволяющая оценить физиологические проявления воздействия пестицида параоксона при пероральном введении в режиме субхронической токсичности. Эта модель представляет большой интерес для изучения хронических эффектов воздействия ФОС. Показано, что основные физиологические характеристики, такие, как локомоторная и исследовательская активность, дыхание, а также мышечная активность, являются параметрами, чувствительными к воздействию ФОС в рамках исследованной модели *in vivo*. В результате нами показана высокая активность препарата рчБуХЭ, использованного в качестве протективного средства. Внутривенное введение биопрепарата в дозе 20 мг/кг не только помогало избежать гибели животных, но и способствовало быстрому восстановлению поведения мышей после отравле-

ния. Установлено, что основные физиологические характеристики животных в группе, получавшей препарат рчБуХЭ, не отличались от показателей в контрольной группе, не подверженной токсическому воздействию параоксона, что указывает на высокую протективную эффективность биопрепарата не только на описанной ранее модели острой токсичности, но и в разработанной биомодели субхронической токсичности.

Снижение моторных функций, исследовательской активности, а также параметров дыхательного процесса и активности мускулатуры, описанных в рамках данной биомодели, может свидетельствовать о повреждении нейронных связей. Детализированное исследование нейрофизиологических характеристик, а также обратимости воздействия ФОС в рамках разработанной биомодели субхронической токсичности представляет значительный интерес и является предметом дальнейших исследований. ●

Исследование поддержано грантом РНФ (№ 16-14-00191). Функциональные тесты частично выполнены при поддержке Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере, программа «УМНИК» 10278ГУ/2015 (для П.А. Паликова).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Eddleston M., Buckley N.A., Eyer P., Dawson A.H. // Lancet (London, England). 2008. V. 371. P. 597–607.
- Ilyushin D.G., Smirnov I.V., Belogurov A.A., Jr., Dyachenko I.A., Zharmukhamedova T.I., Novozhilova T.I., Bychikhin E.A., Serebryakova M.V., Kharybin O.N., Murashev A.N., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2013. V. 110. P. 1243–1248.
- Masson P., Lockridge O. // Arch. Biochem. Biophys. 2010. V. 494. P. 107–120.
- Nachon F., Brazzolotto X., Trovaslet M., Masson P. // Chem.-Biol. Interactions. 2013. V. 206. P. 536–544.
- Terekhov S.S., Smirnov I.V., Shamborant O.G., Bobik T.V., Ilyushin D.G., Murashev A.N., Dyachenko I.A., Palikov V.A., Knorre V.D., Belogurov A.A., et al. // Acta Naturae. 2015. V. 7. P. 136–141.
- Smirnov I., Belogurov A., Friboulet A., Masson P., Gabibov A., Renard P.-Y. // Chem.-Biol. Interactions. 2013. V. 203. P. 196–201.
- Smirnov I., Carletti E., Kurkova I., Nachon F., Nicolet Y., Mitkevich V.A., Débat H., Avalue B., Belogurov A.A., Jr., Kuznetsov N., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2011. V. 108. P. 15954–15959.
- Shenouda J., Green P., Sultatos L. // Toxicol. Appl. Pharmacol. 2009. V. 241. P. 135–142.
- Rosenberg Y.J., Laube B., Mao L., Jiang X., Hernandez-Abanto S., Lee K.D., Adams R. // Chem.-Biol. Interactions. 2013. V. 203. P. 167–171.
- Salerno A., Devers T., Bolzinger M.-A., Pelletier J., Josse D., Brianchon S. // Chem.-Biol. Interactions. 2017. V. 267. P. 57–66.
- Roberts D.M., Aaron C.K. // BMJ (Clinical research ed). 2007. V. 334. P. 629–634.