ВЛИЯНИЕ ВЫСКООЧИЩЕННОЙ БУТИРИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ ЧЕЛОВЕКА, КОНЬЮГИРОВАННОЙ С КОЛЛОИДНЫМ ЗОЛОТОМ, НА АКТИВНОСТЬ В-ЭСТЕРАЗ ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ДИИЗОПРОПИЛФТОРФОСФАТА

Ю.И. Великородная¹, В.А. Антонов¹, А.Я. Почепцов¹, И.А. Дворяшина^{1,2}

¹ФГУП «Научно-исследовательский институт гигиены, токсикологии и профпатологии»
Федерального медико-биологического агентства;

²ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет»

Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра гистологии, эмбриологии, цитологии

Было изучено применение иммобилизованной на наночастицах бутирилхолинэстеразы в качестве средства профилактики при остром отравлении высокотоксичным фосфорорганическими соединениями в дозе, равной ЛД₅₀, в опытах *in vivo*. Введение препарата за 24 часа до воздействия диизопропилфторфосфата предупреждало развитие симптомов острой интоксикации и защищало мышей от гибели. Кроме того, профилактическое введение препарата бутирилхолинэстеразы, конъюгированной с коллоидным золотом, достоверно замедляло падение активности бутирилхолинэстеразы и ацетилхолинэстеразы в плазме крови и оказывало протективное воздействие на холинэстеразы в головном мозге.

Ключевые слова: холинэстеразы, высокоочищенная холинэстераза, коллоидное золото, фосфорорганическое соединение, профилактика.

DOI 10.19163/1994-9480-2019-4(72)-69-72

EFFECT OF HUMAN HIGHLY PURIFIED BUTIRYLHOLINESTERASE OF CONJUGATED WITH COLLOID GOLD ON B-ESTERASE ACTIVITY AFTER EXPOSURE BY DIISOPROPYL FLUOROPHOSPHATE

Yu.I. Velikorodnaya¹, V.A. Antonov¹, A.Ja. Pocheptsov¹, I.A. Dvoryashina^{1,2}

¹FSUE «Research Institute of Hygiene, Toxicology and Occupational Pathology»
of the Federal Medical and Biological Agency;

²FSBEI HE «Volgograd State Medical University» of Public Health Ministry of the Russian Federation,
Department of histology, embryology, cytology

The use of butyrylcholinesterase immobilized on nanoparticles as a means of preventing acute poisoning with highly toxic organophosphates at a dose LD₅₀ in experiments *in vivo* was studied. Entering of the drug 24 hours before exposure to diisopropyl fluorophosphate prevented the development of symptoms of acute intoxication and protected mice from death. In addition, the prophylactic administration of butyrylcholinesterase conjugated to colloidal gold significantly slowed the decrease in the activity of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase in the blood plasma and had a protective effect on cholinesterase in the brain.

Key words: cholinesterase, highly purified cholinesterase, colloidal gold, organophosphorus compound, prevention.

Холинэстеразы и карбоксилэстераза относятся к группе В-эстераз – серинового надсемейства эстераз, которые ингибируются фосфорорганическими соединениями (ФОС) [7]. К настоящему времени разработаны 4 вида антидотов, имеющих собственные механизмы защиты эстераз: антагонисты ацетилхолина (атропин), реактиваторы (оксимы), обратимые ингибиторы холинэстераз (гетероциклические соединения) и антиконвульсанты. Однако каждый из них не обладает универсальным действием по отношению к токсикантам и не может служить в качестве профилактического средства.

На данном этапе одним из наиболее перспективных препаратов, обладающих антитоксическим действием в отношении ФОС, признана сывороточная бутирилхолинэстераза (БХЭ), благодаря способности «перехватывать» токсиканты до того, как они достигнут холинэргических синапсов [9]. Однако для стехиометрической нейтрализации ФОС необходимо введение значительных количеств фермента, например, около 3–4 мг высокоочищенной

БХЭ на кг веса пациента, чтобы противодействовать нескольким LD₅₀ ФОС [11]. Ввиду этого возникла идея модифицировать фермент таким образом, чтобы он мог инактивировать несколько молекул ФОС, что существенно повысило бы его эффективность.

Одним из способов увеличения активности фермента при одновременном сохранении его каталитических свойств является иммобилизация белка на инертном носителе, в качестве которого могут выступать наночастицы золота. В предыдущих работах нами было продемонстрировано, что конъюгация БХЭ с коллоидным золотом (КЗ) увеличивала каталитическую активность фермента [10] и удлиняла время его циркуляции в крови по сравнению с нативной формой БХЭ [1].

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучение высокоочищенной бутирилхолинэстеразы, иммобилизованной на наноразмерных частицах золота в качестве средства профилактики

при остром отравлении высокотоксичными ФОС в опытах *in vivo*.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Высокоочищенную бутирилхолинэстеразу (воБХЭ) выделяли из плазмы человека по усовершенствованной методике, включающей препаративную анионную и аффинную хроматографии, после которых на выходе получали фермент, содержащий минимум балластных веществ. Основные этапы выделения и иммобилизация воБХЭ на 15 нм коллоидном золоте были описаны нами в работе [1]. В результате, активность конъюгата воБХЭ с КЗ (воБХЭ-КЗ) оказалась на 23 % выше по сравнению с нативной формой фермента.

Эксперимент по изучению профилактических свойств иммобилизованной формы воБХЭ проводился на белых беспородных мышах-самцах весом 30–35 г. Исследования проводились в соответствии с требованиями Европейской конвенции по защите экспериментальных животных. Мышей содержали в помещениях с искусственным освещением (8.00 – 20.00 ч. – свет, 20.00 – 8.00 ч. – темнота) при 20–22 °С в условиях свободного доступа к воде и пище.

В качестве токсического агента использовали диизопропилфторфосфат (ДИПФ) (Sigma), относящийся к группе веществ I класса опасности и обладающий выраженным антихолинэстеразным действием. Для уточнения параметров острой токсичности имеющегося в наличии реактива пользовались методом пробит-анализа по Финни. Была определена ЛД₅₀ ДИПФ, которая составила 1,8 мг/кг (при $t \geq 0,95$).

В эксперименте были задействованы 3 группы животных по 12 особей в каждой. I группа – контрольная. Животным на всех этапах эксперимента вводили физраствор. II группа – животным вводили дозу препарата воБХЭ-КЗ по 1 мл внутривентриально с каталитической активностью фермента 1 Ед. Через 24 часа животным этой группы внутримышечно вводили ДИПФ в дозе, равной ЛД₅₀. III группа – животным вводили по 1 мл физраствора внутривентриально, затем через 24 часа ДИПФ в дозе, равной ЛД₅₀.

Через 24 часа после введения ДИПФ у животных контрольных и подопытных групп отбирали кровь из подъязычной вены в пробирки, обработанные гепарином, и центрифугировали при 5000 об./мин в течение 20 мин, полученную плазму переливали в пробирки Эппендорфа. Все биохимические реакции проводили в течение 24 часов после забора крови.

После декапитации животных производили забор образцов тканей печени и головного мозга, которые гомогенизировали на льду в лизирующем Трис-НСl буфере (0,1 М, рН 7,8, 1% Triton X-100, 2 mM ЭДТА). Затем гомогенаты центрифугировали ($\times 9000 g$) при 4 °С в течение 20 мин и в надосадочной жидкости определяли активность эстераз.

Определение активности АХЭ и БХЭ в плазме крови и гомогенатах производилось по оригинальному методу *Ellman* [8], адаптированному для планшетного фотометра SYNERGY HTX (BioTek) и 48-луночных планшетов. В качестве субстрата для АХЭ использовали 0,5 mM ацетилтиохолин-йодид (Sigma), для БХЭ – 5 мМоль бутирилтиохолинйодид (Sigma).

Активность карбоксилэстеразы (КЭ) определяли методом *Escobichon* с применением α -нафтил-ацетата в качестве субстрата [5]. Реакционная смесь состояла из 560 мкл лизирующего буфера, 40 мкл стокового раствора 5 mM α -нафтилацетата в абсолютном спирте и 20 мкл образца плазмы/гомогената. Изменение оптической плотности (А) при длине волны 322 нм измеряли с помощью планшетного фотометра SYNERGY HTX (BioTek) каждые 15 секунд в течение 2 минут и рассчитывали $\Delta A/\text{мин}$. Активность КЭ рассчитывали по молярному коэффициенту абсорбции α -нафтола при 322 нм ($2 \times 10^{-3} \text{ М} \cdot \text{см}^{-1}$) и выражали в виде нмоль/мин*мл плазмы или мг ткани.

Все биохимические реакции ставились в трехкратных повторях при 37 °С. Затем для каждого отдельного случая определялось среднее значение, которое и использовалось для статистических расчетов.

Статистический анализ проводили в программе «Statistika 7.0». Рассчитывались параметры среднего арифметического значения (M) и стандартного отклонения (SD). Сравнения между группами проводили с помощью непараметрического анализа с использованием U критерия Манна – Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе мониторинга за состоянием подопытных животных после введения ДИПФ у мышей III подопытной группы наблюдали симптомы, характерные для действия большинства высокотоксичных ФОС. Через 10–15 минут после введения токсиканта отмечали последовательное развитие гиподинамии, тонических и клонических судорог двигательной мускулатуры, гиперсаливацию, затруднение дыхания вследствие паралича диафрагмы и дыхательных мышц. На высоте развития этих симптомов 3 мыши погибли в срок от 2 до 3 часов. У животных II группы, которым в качестве средства профилактики вводили воБХЭ-КЗ, выживаемость составила 100 %, а наблюдаемые симптомы интоксикации были смазаны и непродолжительны.

Изучение активности холинэстераз в плазме крови экспериментальных животных через 24 часа после введения ФОС показало, что введение иммобилизованной формы воБХЭ оказывало заметное защитное воздействие на эндогенные холинэстеразы. Как видно из представленной табл., после воздействия ДИПФ активность БХЭ и АХЭ в плазме крови снижалась в 6 и 3,4 раза

соответственно, а профилактическое введение препарата воБХЭ-КЗ достоверно замедляло падение до 3,5 и 2,7 раза соответственно.

Изменение активности исследуемых эстераз в плазме крови и гомогенатах тканей у мышей после воздействия ДИПФ ($M \pm SD$)

Эстеразы	Исследуемый объект, ед. измерения	Группа животных		
		I контроль (n = 12)	II ДИПФ (n = 9)	III КЗБХЭ+ДИПФ (n = 12)
БХЭ	Плазма крови, мкмоль/мин* мл	1,429 ± 0,687	0,237 ± 0,134* $p = 0,000032$	0,405 ± 0,044* [†] $*p = 0,000032$ $^†p = 0,0046$
	Печень, нмоль/мин* мг ткани	1,37 ± 0,42	1,113 ± 0,336	1,212 ± 0,124
	Кора больших полушарий, нмоль/мин* мг ткани	0,252 ± 0,089	0,236 ± 0,033	0,228 ± 0,015
	Продолговатый мозг, нмоль/мин* мг ткани	0,289 ± 4,877	0,249 ± 0,027* $p = 0,004918$	0,261 ± 0,040
АХЭ	Плазма крови, нмоль/мин* мл	25,653 ± 5,341	7,519 ± 2,215* $p = 0,000032$	9,639 ± 2,323* [†] $*p = 0,000034$ $^†p = 0,0376$
	Эритроциты, мкмоль/мин* 106Ег	3,04 ± 0,54	0,347 ± 0,314* $p = 0,000028$	0,570 ± 0,271* $p = 0,000032$
	Печень, нмоль/мин* мг ткани	0,480 ± 0,317	0,463 ± 0,093	0,467 ± 0,058
	Кора больших полушарий, нмоль/мин* мг ткани	2,088 ± 0,715	0,486 ± 0,076* $p = 0,000032$	0,472 ± 0,021* $p = 0,000031$
	Продолговатый мозг, нмоль/мин* мг ткани	3,213 ± 13,115	0,831 ± 0,110* $p = 0,000032$	0,913 ± 0,112* $p = 0,000032$
КЗ	Плазма крови, мкмоль/мин* мл	129,427 ± 13,089	69,115 ± 14,002* $p = 0,000032$	64,688 ± 12,324* $p = 0,000032$
	Печень, нмоль/мин* мг ткани	4,148 ± 0,465	2,560 ± 0,775* $p = 0,000053$	2,490 ± 0,368* $p = 0,000032$
	Кора больших полушарий, нмоль/мин* мг ткани	0,150 ± 0,095	0,127 ± 0,032	0,157 ± 0,037 [†] $p = 0,0465$
	Продолговатый мозг, нмоль/мин* мг ткани	0,168 ± 0,043	0,115 ± 0,043* $p = 0,000854$	0,177 ± 0,078 [†] $p = 0,0165$

Статистически значимые различия по сравнению с *контролем, [†]между экспериментальными группами.

При сравнении активности эритроцитарной формы АХЭ между II и III экспериментальными группами также прослеживалась положительная тенденция в сохранении активности фермента после профилактического введения препарата воБХЭ-КЗ, хотя эти данные и не были статически значимыми.

Анализ тканевых форм холинэстераз у мышей контрольной и экспериментальных групп выявил определенные закономерности в активности БХЭ и АХЭ. Так, после воздействия ДИПФ без профилактического введения воБХЭ-КЗ у мышей снижалась активность БХЭ и АХЭ в продолговатом мозге, а также АХЭ в коре больших полушарий. Введение же воБХЭ, конъюгированной с КЗ, поддерживало активность БХЭ в головном мозге, но для поддержания активности АХЭ в нервной ткани такого количества препарата оказалось недостаточно.

Сравнение активности КЭ в опытных группах животных и контроле показало одинаковое снижение фермента в плазме крови и ткани печени после воздействия ДИПФ, однако профилактическое введение препарата воБХЭ-КЗ положительно влияло на активность КЭ в тканях головного мозга.

Различные виды БХЭ (лошадиная, свиная, человеческая, рекомбинантная) достаточно давно используются для предотвращения и лечения последствий, связанных с воздействием высокотоксичных ФОС. Однако, как уже отмечалось выше, для достижения нужной эффективности необходимо вводить большие дозы чужеродного белка, что может негативно сказаться на иммунной системе, особенно если речь идет о «нечеловеческой» БХЭ. Иммунизация воБХЭ на наночастицах золота, как можно увидеть из представленных результатов исследования, помогает даже при использовании небольшого количества препарата достигать значительных результатов. Кроме того, при изучении биологических свойств золотых наночастиц было обнаружено, что они сами способны выступать в роли искусственного фермента (artificial enzyme), выполняющего, в числе прочих, и функцию эстераз [6].

Несмотря на то, что данное количество вводимого препарата воБХЭ, конъюгированной с КЗ, не способно полностью защищать АХЭ в головном мозге, это казалось не критично для выживания животных. Согласно последним данным БХЭ может выступать в качестве «резервного» фермента при недостаточной активности АХЭ, а совместная локализация АХЭ и БХЭ в холинэргических нейронах указывает на потенциальную взаимосвязь между их действиями [2].

Помимо синергетического влияния на АХЭ, эндогенная воБХЭ способна положительно регулировать и активность КЭ в головном мозге, но не в плазме крови и ткани печени. Скорее всего, такой выборочный эффект обусловлен разницей изоформ, представленных в органах. В печени КЭ представлена в основном двумя изоформами: CES1 и CES2, которые вовлечены в процессы

детоксикации и участвуют в липидном обмене [4]. В нервной ткани млекопитающих обнаружены другие изоформы КЭ: CES3 и CES3L, которые у мышей экспрессируются во всех отделах головного мозга и также выступают в качестве защитного фактора нервных клеток по отношению к токсическим веществам [3].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что профилактическое введение даже минимальных доз высокоочищенной бутирилхолинэстеразы, конъюгированной с коллоидным золотом, оказывает профилактическое воздействие, в первую очередь, на холинэстеразы плазмы крови, которые первыми оказываются на пути ФОС, тем самым снижая токсическую нагрузку на БХЭ и АХЭ головного мозга.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Соколов О.И., Селиванов Н.Ю., Селиванова О.Г. и др. / Sokolov O.I., Selivanov N.Ju., Selivanova O.G. i dr. Сравнительный анализ каталитической активности высокоочищенной бутирилхолинэстеразы человека в нативной и конъюгированной с наночастицами золота формах в опытах in vivo / Sravnitel'nyj analiz kataliticheskoj aktivnosti vysokooschishhennoj butirilholinjesterazy cheloveka v nativnoj i konjugirovannoj s nanochasticami zolota formah v opytah in vivo [Comparative analysis of the catalytic activity of highly purified human butyrylcholinesterase in native and gold nanoparticle conjugated forms in vivo experiments] // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета / Vestnik Volgogradskogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta [Journal of Volgograd State Medical University]. – 2017. – Т. 64, № 4. – С. 90–95.

2. Darvesh S., Hopkins D.A. Differential distribution of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase in the human thalamus // J. Comp. Neurol. – 2003. – Vol. 463, № 1. – P. 25–43.

3. Holmes R.S., Cox L.A., VandeBerg J.L. // Genetica. – 2010. – Vol. 138, № 7. – P. 695–708.

4. Hosokawa M. Structure and catalytic properties of carboxylesterase isozymes involved in metabolic activation of prodrugs // Molecules. – 2008. Vol. 13, № 2. – P. 412–431.

5. Karanth S., Pope C. Carboxylesterase and a-esterase activities during maturation and aging: relationship to the toxicity of chlorpyrifos and parathion in rats // Toxicol Sci. – 2000. – Vol. 58, № 2. – P. 282–289.

6. Lin Y., Ren J., Qu X. Nano-gold as artificial enzymes: hidden talents // Adv. Mater. – 2014. – Vol. 26, № 25. – P. 4200–4217.

7. Montella I.R., Schama R., Valle D. The classification of esterases: an important gene family involved in insecticide resistance – a review // Mem. Inst. Oswaldo Cruz. – 2012. – Vol. 107, № 4. – P. 437–449.

8. Reiner E., Sinko G., Skrinjarić-Spoljar M., Simeon-Rudolf V. Comparison of protocols for measuring activities of human blood cholinesterases by the Ellman method // Arh. Hig. Rada Toksikol. – 2000. – Vol. 51, № 1. – P. 13–18.

9. Saxena A., Sun W., Fedorko J.M., et al. Prophylaxis with human serum butyrylcholinesterase protects guinea pigs exposed to multiple lethal doses of soman or VX // Biochemical Pharmacology. – 2011. – Vol. 81. – P. 164–169.

10. Sokolov O.I., Selivanov N.Y., Bogatyrev V.A., et al. A new selective inhibitor of mouse blood plasma carboxylesterase // Reports of Biochemistry and Biophysics. – 2016. – Vol. 468, № 1. – P. 232–234.

11. Sun W., Luo C., Tipparaju P., et al. Effect of polyethylene glycol conjugation on the circulatory stability of plasma-derived human butyrylcholinesterase in mice // Chemico-Biological Interactions. – 2013. – Vol. 203, № 1. – P. 172–176.

Контактная информация

Великородная Юлия Ивановна – зав. лабораторией патоморфологии, ФГУП Научно-исследовательский институт гигиены, токсикологии и профпатологии ФМБА России, e-mail: velikorodnaya@rihtop.ru