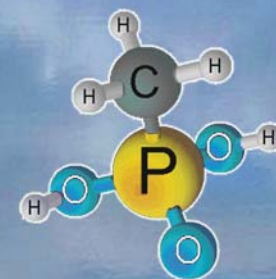


**БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ
МЕТИЛФОСФОНАТОВ:
влияние метилфосфоновой кислоты
на гомеостаз, методы исследования**

Монография



ISBN 978-5-4217-0113-2



9 785421 701132

Курганский
государственный
университет



редакционно-издательский
центр

43-38-36

**Министерство образования и науки Российской Федерации
Курганский государственный университет**

**БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ МЕТИЛФОСФОНАТОВ:
ВЛИЯНИЕ МЕТИЛФОСФОНОВОЙ КИСЛОТЫ
НА ГОМЕОСТАЗ, МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Монография

Курган 2011

УДК 577:591.6:574.24

ББК 28.672:52.84

Б 63

Рецензенты

ведущий научный сотрудник клинико-экспериментального лабораторного отдела ФГУ «РНЦ «ВТО» им. Г.А. Илизарова Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации» д-р биол.наук **Е.Л. Матвеева**; заведующий кафедрой гигиены с основами экологии ГОУ ВПО ТюмГМА Минздравсоцразвития Российской Федерации, д-р мед.наук, проф. **П.Я. Шаповалов**.

Печатается по решению научного совета Курганского государственного университета.

Б 63 Биологическая активность метилфосфонатов: влияние метилфосфоновой кислоты на гомеостаз, методы исследования: Монография / О.М. Плотникова, С.Н. Лунева, А.М. Корепин, Н.Н. Матвеев, И.В. Савинова.- Курган: Изд-во Курганского гос. ун-та, 2011. – 120 с.

В монографии обобщены литературные данные по практическому применению фосфорорганических соединений, в том числе боевых отравляющих веществ, их химической и физиологической активности; рассмотрены пути биотрансформации метилфосфонатов. Приведено описание экспериментальных методик определения важнейших показателей белкового, углеводного и липидного обмена. Показано, что метилфосфонаты в силу особенностей своего строения могут влиять на метаболизм животных.

Монография предназначена для студентов, аспирантов, преподавателей биологии, химии, биохимии, токсикологии.

Рис. – 39, табл. – 10, библиограф. – 327 назв.

ISBN 978-5-4217-0113-2

© Курганский
государственный
университет, 2011
© Авторы, 2011

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	4
Список использованных сокращений	6
Глава 1. ЭКОТОКСИКОЛОГИЯ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ	7
1.1. Фосфорорганические соединения: особенности строения и химической активности	7
1.2. Некоторые аспекты физиологической и антихолинэстеразной активности фосфорорганических соединений	11
1.3. Практическое применение фосфонатов	15
1.4. Метилфосфонаты как боевые отравляющие вещества	17
1.5. Особенности биотрансформации метилфосфонатов	22
1.6. Некоторые аспекты защитных и детоксикационных механизмов организма на воздействие ксенобиотиков	25
Глава 2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ВЛИЯНИЯ МЕТИЛФОСФОНОВОЙ КИСЛОТЫ НА ПОКАЗАТЕЛИ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ МЕЛКИХ ГРЫЗУНОВ	35
2.1. Количественное определение содержания общего белка и белковых фракций в крови	37
2.2. Количественное определение олигопептидов и веществ низкой и средней молекулярных массы в крови	38
2.3. Количественное определение в крови продуктов перекисного окисления белков в виде альдегидо- и кетодинитрофенилгидразонов .	41
2.4. Количественное определение содержания гликогена в печени и мышечной ткани	43
2.5. Количественное определение креатина и креатинфосфата в мышечной ткани	45
2.6. Количественное определение содержания лактата и пирувата в крови .	47
2.7. Определение ферментативной активности креатинкиназы и лактатдегидрогеназы в крови	49
2.8. Количественное определение малонового диальдегида, активности каталазы и эритроцитарной супероксиддисмутазы в крови .	51
2.9. Определение количества общих липидов, общего холестерина и триглицеридов в крови	53
Глава 3. МЕТИЛФОСФОНОВАЯ КИСЛОТА И ЕЕ ВЛИЯНИЕ НА МЕТАБОЛИЗМ МЕЛКИХ ГРЫЗУНОВ	57
3.1. Метилфосфоновая кислота и особенности метаболизма белков мелких грызунов	57
3.2. Метилфосфоновая кислота и особенности энергетического метаболизма у мелких грызунов	71
3.3. Метилфосфоновая кислота и особенности липидного обмена у мелких грызунов	87
Заключение	95
Список литературы	98

ВВЕДЕНИЕ

Исследования устойчивости живых организмов к действию загрязняющих веществ антропогенного характера, в первую очередь ксенобиотиков, которые не входят в биотический круговорот, а являются прямым или косвенным продуктом хозяйственной деятельности человека, очень актуальны.

В соответствии с Федеральным законом «Об охране окружающей среды» научные исследования в области охраны окружающей среды проводятся в целях оценки последствий негативного воздействия хозяйственной и иной деятельности человека на окружающую среду; разработки и совершенствования показателей комплексной оценки воздействия на окружающую среду, способов и методов их определения (статья 70) [252]. Федеральный закон «Об уничтожении химического оружия» при проведении работ по хранению и уничтожению химического оружия одной из основных задач ставит разработку и внедрение эффективных методов оценки состояния окружающей среды в зонах защитных мероприятий, позволяющих контролировать соблюдение стандартов безопасности для разных объектов окружающей среды (статья 13) [253]. «Санитарные правила по определению класса опасности токсичных отходов производства и потребления» в целях установления и предотвращения вредного воздействия токсичных отходов на среду обитания и здоровье человека предусматривают экспериментальную оценку степени опасности отходов на теплокровный организм в остром и хроническом санитарно-токсикологическом эксперименте. Такая оценка является обязательной в случаях, когда возможно контактное, ингаляционное или комплексное действие компонентов отхода на здоровье человека [232].

Фосфорорганические соединения (ФОС) наряду с хлорорганическими соединениями и тяжелыми металлами выступают наиболее опасными ксенобиотиками окружающей среды (Программа ООН по окружающей среде, 2005 г.), поэтому проведение исследований по изучению влияния ФОС на живые (особенно на теплокровные) организмы является актуальным [52, 53, 104].

Опираясь на эти законы и нормативные документы, была выполнена исследовательская работа по изучению влияния на метаболизм теплокровных животных фосфонатов – распространенных веществ антропогенного происхождения. В исследовании использовали метилфосфоновую кислоту (МФК) в виде ее натриевой соли – метилфосфонат натрия. Вопрос влияния МФК на представителей растительного и животного мира практически не изучен. Существуют лишь отдельные данные о влиянии МФК на рост и ферментативную активность растений [177, 178, 237].

Важной особенностью выполненной работы выступает определение чувствительности биохимических методов по выявлению метаболических изменений в организме животных при действии МФК в малых дозах. Малые и сверхмалые дозы отравляющих веществ (ОВ) и различных ксенобиотиков, а также продуктов их трансформации, безопасные в рамках санитарно-гигиенических нормативов и сложно идентифицирующиеся по стандартным методикам количественного химического анализа, могут являться значимыми для экосистем. Это связано со сложностью и порой высокой стоимостью химических анализов, а также с фактом, что некоторые вещества могут быть весьма токсичными уже при низких концентрациях и не фиксироваться известными приборами [23, 24, 54, 115, 248, 273].

Результаты работы, выполненной на базе лабораторий экотоксикологии Регионального центра по обеспечению государственного экологического контроля и мониторинга объектов по хранению и уничтожению химического оружия по Курганской области и биохимии клинико-экспериментального научного отдела ФГУ «Российский научный центр "Восстановительная травматология и ортопедия" имени академика Г.А. Илизарова», могут служить обоснованием необходимости усиления экологического контроля над уровнем загрязнения фосфонатами объектов окружающей среды.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- АМФ, АДФ – аденозинмонофосфат, аденозиндифосфат, аденозин-трифосфат
- АТФ – аденозинтрифосфат
- АОС – антиоксидантная система
- АФГ – альдегидофенилгидразоны
- АФК – активные формы кислорода
- ВНСММ – вещества низкой и средней молекулярной массы плазмы (пл.) и эритроцитов (эр.) крови, регистрируемые при $\lambda=238-306$ нм и $\lambda=238-306$ нм
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ДНФГ – динитрофенилгидразин-2,4
- ИИ – индекс интоксикации
- КК – креатинкиназа
- КрФ – креатинфосфат
- КФГ – кетофенилгидразоны
- ЛД50 – полулетальная доза
- ЛДГ – лактатдегидрогеназа
- МДА – малоновый диальдегид
- МФК – метилфосфоновая кислота
- НАД – никотинамиддинуклеотид
- НАДН – никотинамиддинуклеотид восстановленный
- НСТ – нитросиний тетразолий
- ОБУВ – ориентировочный безопасный уровень воздействия
- ОВ – отравляющие вещества
- ОП – олигопептиды плазмы и эритроцитов крови
- ПВК – пировиноградная кислота, пируват
- ПДК – предельно допустимая концентрация
- ПОБ – перекисное окисление белков
- ПОБ₂₇₀ – продукты ПОЛ, регистрируемые при $\lambda=270$ нм
- ПОБ₃₆₃₊₃₇₀ – продукты ПОЛ, регистрируемые при $\lambda=363+370$ нм
- ПОЛ – перекисное окисление липидов
- СМД – сверхмалые дозы
- СОД – супероксиддисмутаза
- ТХУ – трихлоруксусная кислота
- ФОВ – фосфорорганические отравляющие вещества
- ФОС – фосфорорганические соединения
- ФПСРО – функциональный показатель свободнорадикального окисления
- ФСТ – фосфорсодержащие токсиканты
- цАМФ – циклоаденинмонофосфат
- ЭИ – эндогенная интоксикация
- VX – вещество ви-икс

Глава 1. ЭКОТОКСИКОЛОГИЯ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

1.1. Фосфорорганические соединения: особенности строения и химической активности

Химия фосфорорганических соединений является многообразной и сложной, так как атом фосфора благодаря своим структурным возможностям может проявлять различную валентность, координационность и степень окисления, образовывать разнообразные молекулярные системы [170, 172, 295].

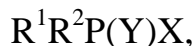
В настоящее время точкой отсчета истории фосфорорганических соединений принято считать попытку П. Вокленда в 1811 году выделить из мозговой ткани лецитин, который был идентифицирован как первый фосфорорганический продукт. Фундаментальные работы немецкого химика А. Михаэлиса и русского ученого А.Е. Арбузова в начале прошлого века привели к возможности синтеза различных производных ФОС, в том числе эфиров алкилфосфоновых кислот [6].

В 1930-40 годы для фосфорорганических соединений были открыты токсические свойства и физиологическая активность. В это время получены и нашли широкое применение высокотоксичные фосфорорганические инсектициды, а также боевые ОВ (Г. Шредер), которые были взяты на вооружение Германией.

Высокая биологическая активность ФОС послужила толчком к многоплановому и бурному развитию химии этих соединений в послевоенные годы. В 1960-70 годы были синтезированы тысячи органических соединений фосфора, в том числе с избирательной токсичностью, изучена их холинэстеразная активность [112, 171, 212, 293, 295].

Классификация ФОС сложна и неоднозначна. По строению фосфорной группы органические соединения фосфора подразделяют на фосфины (R_3P) и их окиси (R_3PO), сульфиды (R_3PS), имины (R_3PNR^1), фосфинометилены ($R_3P=CR^1R^2$); соединения фосфония ($R_4P^+X^-$); фосфонистые (RPO_2H_2), фосфинистые (R_2POH), фосфоновые (RPO_3H_2), фосфиновые (RPO_3H_2) кислоты и их сернистые, азотистые производные; органические производные фосфорноватистой (H_3PO_2), фосфористой (H_3PO_3), фосфорной (H_3PO_4) кислот [27, 112, 171].

Химическое строение органических соединений пятивалентного четырехкоординационного фосфора может быть описано общей формулой

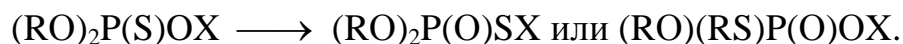


где R^1 и R^2 – алкильные и арильные, алкоксильные и арилоксильные, алкилтионильные и алкиламиногруппы; Y – тио- или оксогруппы (=S или =O), X – различные легкогидролизуемые галоген-, кислород-, азот-, серосодержащие группы.

По физическим свойствам эти фосфорорганические соединения различны. Большинство из них являются маслянистыми жидкостями или кристаллическими веществами; они, как правило, нерастворимы или плохо растворимы в воде (хотя некоторые из них, например, зарин, смешиваются с водой в любых отношениях), хорошо растворимы в органических растворителях. Большинство органических соединений фосфора имеют специфический запах, часто не очень приятный. Плотность многих ФОС лежит в интервале 1,1-1,7 г/см³ (однако для ви-икс и зомана плотность равна 1,014 и 1,029 соответственно). ФОС обладают разной степенью летучести: есть вещества с летучестью более 10 мг/л (для зарина 12 мг/л) и менее 0,01 мг/л (для вещества типа ви-икс 0,005 мг/л) [4, 214, 257].

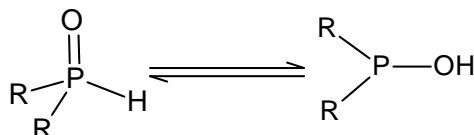
Большинство фосфорорганических соединений достаточно стабильны в нейтральной среде, умеренно – в кислых средах, однако они хорошо гидролизуются в щелочных растворах.

Важнейшее свойство многих фосфорорганических соединений – способность к обратимым изомеризациям [68, 100, 101, 175, 300], в результате которых тионфосфаты $(RO)_2P(S)OX$ переходят в различные фосфаты, являющиеся зачастую более токсичными, чем исходные вещества:



Это свойство используется и в производстве пестицидов – их получают в более стабильной и менее токсичной форме $P=S$, которая в организме-мишени превращается в более токсичную форму $P=O$. Изомеризация фосфорорганических соединений может происходить во влажных и теплых климатических условиях, хотя и медленно.

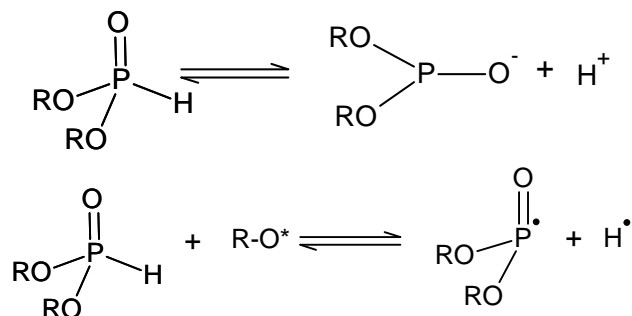
Важнейшую роль в возможности фосфорорганических соединений к образованию новых соединений играет способность гидрофосфорильных соединений к таутомерным превращениям, которые могут приводить к необычным структурным изменениям веществ [170, 169]:



Для оптически активных соединений пятикоординационного фосфора $P(XYZVW)$ изомеризационные процессы могут происходить многократно, что сопровождается рацемизацией фосфоранов и изменением биологической активности этих соединений [170].

Большой класс соединений составляют фосфиты [169], особенно интересны диалкилфосфиты $(RO)_2P(O)H$. Эти соединения могут выступать хороши-

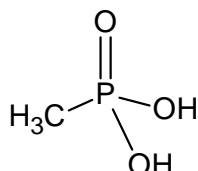
ми алкилирующими агентами, легко депротонизироваться с образованием амбидентных анионов с высокой нуклеофильностью по кислороду и по фосфору, образовывать под действием перекисей фосфит-радикалы:



Новые перспективы в получении разнообразных ФОС появились с открытием перегруппировки Арбузова [6], которая позволила легко создавать фосфор-углеродную связь (С-Р-связь) и ознаменовала практически новую эпоху в химии фосфора - эпоху фосфорорганических соединений с С-Р-связью.

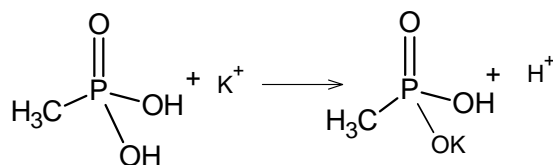
Среди фосфорорганических соединений с С-Р-связью наиболее изучены фосфонаты, в ряду которых большой интерес представляют алкилфосфоновые кислоты и алкилфосфонаты, имеющие моно-, ди- и олигостроение [211, 290, 299, 316, 327].

В основе производных метилфосфонатов лежит метилфосфоновая кислота - гигроскопичное белое кристаллическое вещество с температурой плавления 105°C, растворимое в полярных органических растворителях [192]. МФК имеет следующую структуру:

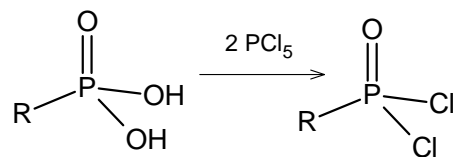


С химической точки зрения метилфосфоновая кислота может рассматриваться как фосфорная, в которой один гидроксил замещен на метил. Метилфосфоновая кислота, имея схожие с фосфорной кислотой константы ионизации: для фосфорной кислоты pK_1 и pK_2 , по данным Д. Пурдела [216] (в скобках - по данным Ван Везера [27]), равны 1,97 (2,1) и 6,82 (7,1), а для метилфосфоновой – 2,35 (2,3) и 7,10 (7,9), может вступать в некоторые реакции аналогично фосфорной.

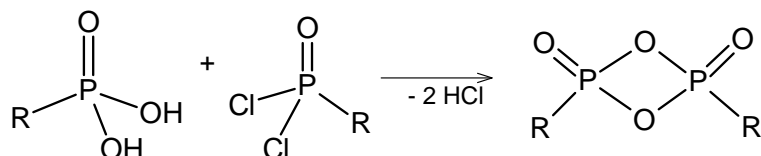
Алкилфосфоновые кислоты как двухосновные кислоты средней силы с основаниями образуют кислые и средние соли, некоторые из них имеют полимерный характер:



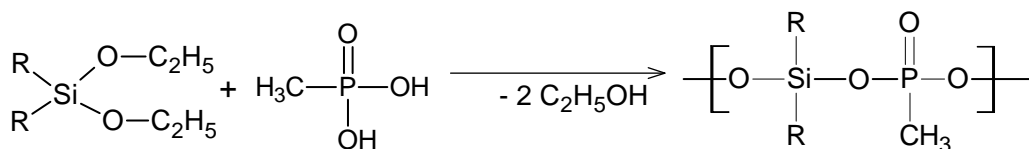
Адкилфосфоновые кислоты, реагируя с четырехфтористой серой и пятихлористым фосфором или хлористым тионилем, образуют фтор- и хлорангидриды [323]. Например, образование хлорангидрида идет по схеме:



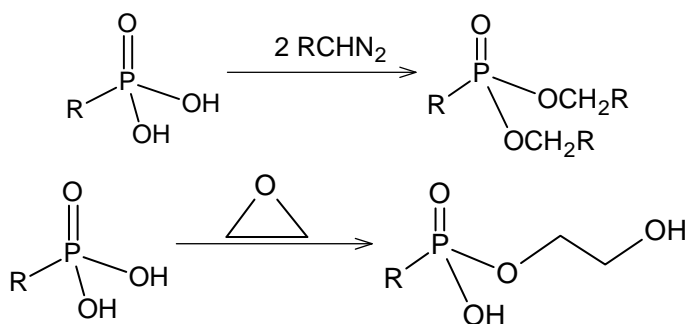
Из фосфоновых кислот при нагревании путем дегидратации образуются ангидриды, которые получают и при взаимодействии эквимолекулярных количеств кислоты и дихлорангидрида:



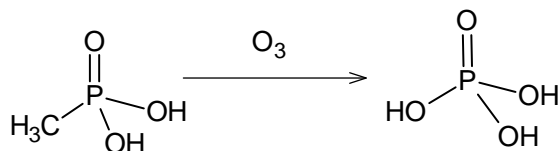
Фосфоновые кислоты могут быть превращены в разнообразные смешанные ангидриды [323]. Так, с силикогидридами, силанолами и алкоксисиланами они дают кремнийсодержащие ангидриды, например:



Фосфоновые кислоты непосредственно не этерифицируются спиртами и фенолами, но после предварительного активирования карбодимидом или другими реагентами образуют фосфонаты. Для получения фосфонатов на основе фосфоновых кислот можно использовать реакции с диазоалканами, окисью этилена:



При действии озоном метилфосфоновая кислота в присутствии солей некоторых металлов, например, солей кобальта, легко окисляется до фосфорной кислоты:



Подобно другим органическим кислотам фосфоновые кислоты вступают в разнообразные превращения по углеводородному радикалу. Так, арилфосфоновые кислоты дают хорошие результаты в реакции электрофильного замещения, β -оксифосфоновые кислоты легко дегидратируются до винилфосфоновых кислот и т.д. [170]. Фосфоновые кислоты, содержащие сильные акцепторные группы типа пергалогеналкильных и некоторых замещенных арилов, реагируют с избытком щелочи с разрывом фосфор-углеродной связи. При длительном нагревании фосфоновые кислоты отщепляют воду и образуют олигоконденсированные соединения.

Для фосфорорганических соединений с фосфор-углеродной связью, обладающих специфическим строением атома фосфора (возможность быть донором и акцептором электронов), наличием малополярной С-Р-связи (способность к гомолитическому разрыву), уникальными многообразными свойствами [139, 170, 172, 190, 301], была обнаружена высокая биологическая активность и комплексообразующая способность, поэтому они нашли самое широкое применение в различных отраслях: промышленности, сельском хозяйстве, быту, медицине и военном деле [266-268, 314].

Информация по физико-химическим, токсическим свойствам, нормативные данные достаточно полно изложены в различной литературе [4, 88, 103, 105, 166, 174, 191, 210, 212, 234, 257, 281], кроме того, их можно получить в Международном регистре потенциально токсичных химических веществ [157, 280, 281].

1.2. Некоторые аспекты физиологической и антихолинэстеразной активности фосфорорганических соединений

Важнейшим свойством биологической активности фосфорорганических соединений является их антихолинэстеразная активность. Физиологической и антихолинэстеразной активности и токсикологии фосфорорганических соединений и особенно фосфорорганических ингибиторов посвящено достаточно много работ [67, 81, 82, 86, 87, 90, 91, 143, 175, 176, 226].

В организме человека известны два основных типа холинэстераз: ацетилхолинэстераза, содержащаяся в синапсах и эритроцитах, и холинэстераза сыворотки крови. Сывороточная холинэстераза - разнородная группа ферментов, содержащихся в сыворотке крови, печени и некоторых других органах. Механизм действия фосфорорганических соединений с антихолинэстеразной активностью подробно изучен [17, 18, 52, 98, 108, 140, 165, 180, 231, 261, 307, 308].

Многими исследователями изучались вопросы взаимосвязи между биологической активностью, пространственным, электронным строением и химиче-

ской реакционной способностью [49, 83, 89, 90, 100, 242, 258, 261, 262, 297, 298, 300], последнее обобщение исследований в этой области проведено коллективом авторов в 2002 году [176].

Причиной высокой токсичности ФОС является химическое родство с ацетилхолином и возможность их взаимодействия с холинэстеразами, следствием чего является потеря ферментами каталитической активности по отношению к ацетилхолину – передатчику нервных импульсов.

В норме после прохождения нервного импульса сразу же происходит гидролиз ацетилхолина и высвобождение активных центров ацетилхолинэстеразы. При взаимодействии фосфорорганического соединения с холинэстеразой эстеразный центр прочно связывается с остатком фосфорсодержащей кислоты и разрушения ацетилхолина не происходит, что приводит к судорогам и параличам [219].

Антихолинэстеразная и фосфорилирующая способность фосфорорганических соединений зависит от уровня дефицита электронной плотности на атоме фосфора, от прочности эфирной связи фосфора с кислотным остатком, а также от стерических факторов и гидрофобных взаимодействий.

Так, для соединений типа $(RO)_2P(S)X$ было показано, что этоксильные производные на порядок более токсичны, чем метоксильные; для соединений типа $CH_3(RO)P(O)SR$ выявлено, что при удлинении O- и S-алкильных радикалов резко возрастает антихолинэстеразное действие [49, 90, 103, 107].

Холинэстеразы имеют много общего с холинорецепторами, поэтому на антихолинэстеразную активность фосфорорганических соединений влияет и их взаимодействие с холинорецепторами. При этом фосфорорганические соединения могут оказывать на холинорецепторы возбуждающее и блокирующее действие [50, 67, 209]. Для взаимодействия фосфорорганических соединений с холинорецепторами обязательно наличие в них катионного центра, блокирующее действие может осуществляться только за счет взаимодействия анионного центра с электрофильным участком холинорецептора [219, 227].

Представления о неантихолинэстеразных механизмах действия антихолинэстеразных веществ обобщены в монографии В.Б. Прозоровского [208]. Например, глифосат, являясь ингибитором фермента растений EPSP-синтаза (5-еноилпирувоил-шикимат-3-фосфат синтазы), блокирует синтез хоризмата (предшественника фенилаланина, тирозина и триптофана), синтез которого у животных происходит по другому механизму [288].

Между антихолинэстеразной активностью и токсичностью фосфорорганических соединений *in vitro* далеко не всегда существует прямая зависимость: некоторые фосфорорганические соединения проявляют высокую токсичность, но слабую антихолинэстеразную активность и наоборот [103]. Часто это зави-

сит от пути поступления токсиканта в организм. Например, в работе [308] показано, что при внутривенном поступлении в организм фосфорорганических соединений существует четкая корреляция между токсичностью и антихолинэстеразной активностью. В работах [76, 108] отмечено, что антихолинэстеразное действие фосфорорганических пестицидов повышается при индукции монооксигеназной ферментной системы печени.

Эти факты предполагают, что в организме фосфорорганические соединения могут превращаться в более активные антихолинэстеразные вещества, а суммарный эффект антихолинэстеразного действия зависит от состояния метаболизирующей системы организма [176].

Высокая реакционная способность фосфорорганических соединений и многообразие их структуры объясняют легкость, с которой эти соединения вступают в различные метаболические превращения. Обзор отдельных химических реакций метаболизма фосфорорганических соединений приведен в работах У. Доутермана, Ю.С. Кагана, С.С. Михайлова, В.И. Розенгарта [99, 68, 103, 105, 107, 164, 217, 218, 220, 296].

Авторы подчеркивают, что метаболизм фосфорорганических соединений – многоплановый сложный процесс с участием ферментных систем, включающий фосфорилирование, гидролиз по фосфатазному, карбоксиэстеразному, амидазному типам, окисление различных групп, восстановление, дегидрогалогенирование, переалкилирование [217]. При этом в одних случаях фосфорорганические соединения могут терять свою биологическую активность (процесс детоксикации), а в других, наоборот, их токсичность может повышаться (процесс активации). Ферменты, участвующие в метаболизме фосфорорганических соединений, содержатся главным образом в микросомах клеток, особенно печени, а также в сыворотке крови многих видов животных [106, 219].

Так, гидролиз как наиболее распространенный и простой путь распада, сопровождающийся разрывом связей фосфор–электроакцепторная группа, например, P–F и P–OAlk (ферменты фосфатазы), сложноэфирных связей COOR и CONR₂ (ферменты карбоксиэстеразы и амидазы), приводит чаще всего к детоксикации фосфорорганических соединений в живом организме. Глутатионзависимое деалкилирование или деарилирование ФОС также способствует образованию более простых и менее токсичных продуктов метаболизма, которые, однако, при накоплении в организме могут вызывать токсические эффекты [213, 218].

Метаболическая десульфуризация – изомеризация по типу $P=S \rightleftharpoons P=O$ – приводит, наоборот, к образованию более токсичных P=O-содержащих изомеров, что характерно для ферментных систем насекомых [179].

Различные окислительные реакции протекают в печени при участии ферментных систем группы оксидоредуктаз, которые далеко не всегда ведут к де-

токсикации исходных окисляемых фосфорорганических ксенобиотиков. Так, образующиеся при окислении некоторых фосфорорганических соединений альдегиды, сульфоны, циклические продукты внутримолекулярной конденсации являются более токсичными по сравнению с исходными соединениями.

Некоторые группы фосфорорганических соединений могут восстанавливаться, при этом восстановление нитрогруппы до аминогруппы приводит к уменьшению полярности и антихолинэстеразной активности, а восстановление альдегидной группы – к увеличению токсичности.

В живом организме может протекать спонтанно реакция дегидрогалогенирования хлорсодержащих фосфорорганических соединений, например, хлорофос при дегидрохлорировании образует более токсичный дихлофос [142]. Для некоторых фосфорорганических соединений была выявлена высокая антихолинэргическая и антибактериальная [40] активность наряду с низкой токсичностью у теплокровных животных.

Подробно изучено действие фосфорорганических ингибиторов (карбофос, тиофос, метафос и др.) на морфологические показатели животных (мышей, крыс, кошек, кроликов) при различных путях их введения [143]. Показано, что у животных при действии токсических доз этих токсикантов возникают различные сосудистые расстройства, дистрофические и очаговые некробиотические изменения в головном мозге и внутренних органах, а при действии низких доз, не вызывающих видимых признаков отравления, отмечено снижение активности холинэстеразы [22, 142, 226].

Исследования по изучению действия некоторых фосфорорганических токсикантов были выполнены рядом авторов на теплокровных животных. При этом определяли показатели крови и активность холинэстеразы. Так, при отравлении кошек фосарбином наблюдался лейкоцитоз, уменьшение активности холинэстеразы до 34% от контроля через сутки после отравления [57, 86].

Острая интоксикация лабораторных животных фосфорорганическими токсикантами (октаметил, хлорофос) сопровождается повышением содержания адреналина в крови и снижением его концентрации в надпочечниках с одновременным возрастанием содержания норадреналина в надпочечниках и концентрации серотонина в крови и тканях головного мозга [22, 133].

Из всех известных пестицидов выявлены половые различия только по отношению к фосфорсодержащим [129]: более чувствительны самки, чем самцы (например, для самцов токсичность паратиона в 6 раз ниже). Это можно объяснить ферментами монооксигеназной системы, активность которых у самцов значительно выше, чем у самок, что обеспечивает более быструю детоксикацию ксенобиотиков.

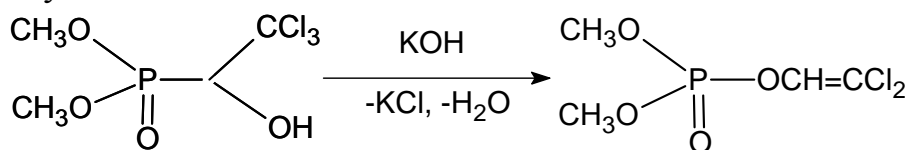
Для людей, отравившихся фосфорорганическими соединениями (хлорофос, карбофос, меркаптофос, метилмеркаптофос), характерны изменения состава периферической крови, что является симптомом общетоксического действия и существенно зависит от химического строения препаратов. При действии низких доз хлорофоса и изофоса нарушается фагоцитарная активность нейтрофилов, подавляются их фагоцитарные свойства, снижается фосфатазная активность лейкоцитов, что свидетельствует об изменении иммунологической реактивности организма. При тяжелых отравлениях фосфорорганическими соединениями (хлорофос, фосфамид, карбофос) характерны такие изменения в печени, как нарушение выделительной функции, свертывающей системы крови, расстройство регионарной гемодинамики с последующим развитием явлений белковой дистрофии и холостаза [11, 133].

Таким образом, разнообразное строение и высокая реакционная способность различных фосфорорганических соединений обуславливают метаболические пути в живых организмах как детоксикационного, так и активационного типа. Фосфонаты среди всех фосфорорганических соединений обладают наиболее высокой и зачастую агрессивной физиологической активностью, поэтому нашли свое применение как лекарственные препараты против раковых клеток и глаукомы, а также в качестве пестицидов и боевых отравляющих веществ.

1.3. Практическое применение фосфонатов

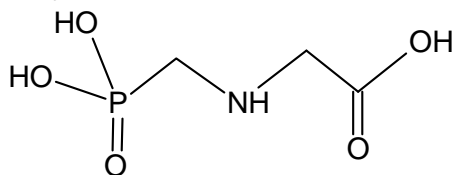
Многие фосфонаты с высокой физиологической активностью и, как считалось долгое время, малой токсичностью для человека широко используются в качестве пестицидов, причем в первую очередь инсектицидов (карбофос, хлорофос), гербицидов (глифосат, бенсулид) и фунгицидов (пиразофос, хинозан) [12, 20, 58, 59, 158, 210, 272, 297, 311].

Общеизвестный дихлофос (О,О-диметил-О-2,2-дихлорвинилфосфат), получаемый из не менее известного хлорофоса, долгое время повсеместно применялся для борьбы с насекомыми в быту, однако в последнее время фосфорорганические инсектициды вытесняются более безопасными для человека пиретроидами [105]. Схема образования О,О-диметил-О-2,2-дихлорвинилфосфата (дихлофоса) из О,О-диметил-(2,2,2-трихлор-1-оксиэтил)-фосфоната (хлорофоса) имеет следующий вид:



Дополнительный интерес исследователей вызвали соединения с С-Р-Н молекулярным фрагментом [132, 161, 193, 310, 320, 322], например,

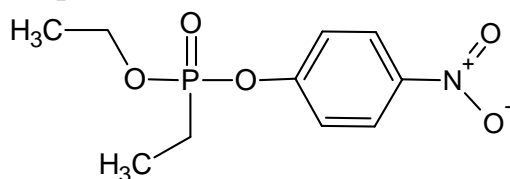
N-(фосфометил)-глицин, который получил широчайшее распространение во всем мире как гербицид широкого спектра действия – глифосат («Раундап», «Родео», «Аккорд») [215, 284]. Структурная формула N-(фосфометил)-глицина (глифосата) имеет следующий вид:



Глифосат относят к малотоксичным гербицидам, что подтверждается высокой полулетальной дозой ЛД50=5600 мг/кг веса при введении крысам [319]. Однако некоторые авторы указывают на мутагенность глифосата [288, 302]. Под действием глифосата происходит снижение активности ферментов в печени крыс и выработки половых гормонов у мышей на 90% [291]. При распаде глифосата образуется аминометилфосфоновая кислота – устойчивый метаболит с периодом полураспада в почве от нескольких месяцев до 2-3 лет. Под ее воздействием у крыс отмечается увеличение активности молочной дегидрогеназы и уменьшение веса печени [289].

Известно использование алкилфосфонатов в качестве хороших комплексонов в нефтедобывающей промышленности для ингибирования солеотложения при транспортировке нефти; в качестве экстрагентов для извлечения олова, мышьяка, урана и сорбентов для разделения редкоземельных металлов [69, 74, 102, 241]. Алкилфосфонаты, являясь поверхностно-активными веществами, обладают эффективной смачивающей способностью, их применяют в качестве моющих средств, флотореагентов, антистатиков, диспергаторов кальциевых мыл, флокулянтов, эмульгаторов [270, 271].

Довольно обширна и группа лекарственных препаратов – производных алкилфосфонатов [29, 283]. В их числе до сих пор широко применяемый для лечения глаукомы армин, противораковый препарат глицифон, противоалкогольное средство фосфабензид [45], антидепрессант амфазид [235], антибиотики группы фосфоновой кислоты [201], а также аминофосфонаты с нейротропной антиВИЧ-активностью [313]. Структурная формула О-этил-О-(п-нитрофенил)этилфосфоната (армина):

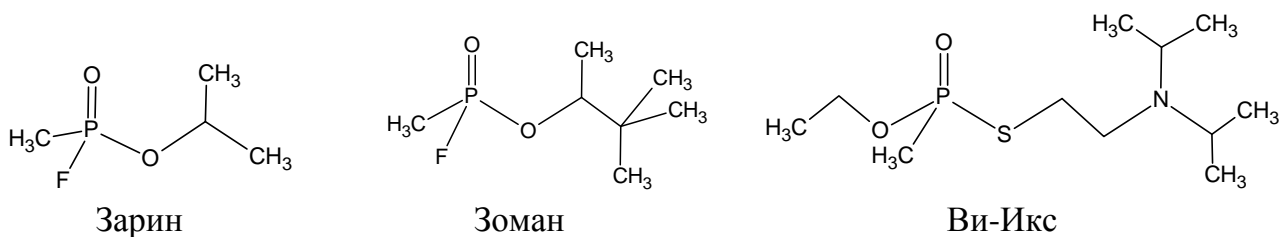


При лечении остеопороза применяются различные бифосфонаты, которые, прочно связываясь с костным минералом, подавляют резорбцию костной ткани [216]. Это целый класс терапевтических средств для лечения различных

заболеваний костей и мягких тканей, сопровождающихся нарушением обмена кальция. К ним относят производные фосфоновых кислот с P-C-P фрагментом общей химической формулы: $A(CH_2)_nCX(PO(OH)_2)_2$, где $n=0-7$, а группами А и Х могут быть водород, галогены, гидроксо-, amino- и тиольные группы, различного строения алкилы, арилы и гетероциклы.

1.4. Метилфосфонаты как боевые отравляющие вещества

Метилфосфонаты используются также как боевые ОВ [4, 257]. В эту группу ОВ нервно-паралитического действия с общей формулой $CH_3(RO)P(O)X$ в первую очередь входят зарин (GB, изопропилметилфторфосфонат) с $R=OCH(CH_3)_2$ (i-Pr – изопропил), $X=F$, зоман (GD, пинаколилметилфторфосфонат) с $R=OCH(CH_3)C(CH_3)_3$ (Pin – пинаколил), $X=F$, ви-икс (VX, О-изобутил-S-(2-диэтиламиноэтил)метилтиофосфонат) с $R=OCH_2CH(CH_3)_2$ (i-Bu – изобутил), $X=SCH_2CH_2N(CH(CH_3)_2)_2$ (Et – этил), структурные формулы которых следующие:



Основное количество запасов химического оружия в России (32,3 тыс. т) представляют именно эти фосфорорганические отравляющие вещества (ФОВ).

Согласно Конвенции о запрещении разработки, производства, применения химического оружия и его уничтожения [121, 253] в России на пяти объектах в четырех регионах идет уничтожение химического оружия: в г. Щучье Курганской обл., г. Почеп Брянской обл., п. Марадыковский Кировской обл., г. Камбарка и п. Кизнер Удмуртской Республики. В п. Горный Саратовской обл. и п. Леонидовка Пензенской обл. уничтожение химического оружия уже закончено [15, 250, 251, 265]. Проводится комплексный экологический мониторинг окружающей среды этих объектов [9, 265, 276].

По состоянию на ноябрь 2010 года было уничтожено более 60% мировых запасов химического оружия, в России данный показатель равен 48,5% (19,4 тыс. т) от всего российского запаса [75]. На Щучанском объекте на момент начала работ по переработке химического оружия хранилось 5457 тонн (13,6 % от общего запаса ОВ, имеющих в РФ), из которых по состоянию на конец декабря 2010 года уничтожено около 31,6% (1725 т зарина) [97].

В табл. 1 приведена характеристика фосфорорганических ОВ [214].

Таблица 1

Характеристика основных фосфорорганических отравляющих веществ нервно-паралитического действия (по данным З. Франке [257], В.Н. Александрова [4], О.Ю. Растегаева, В.Н. Чуписа [214], Т.Я. Ашихминой [9])

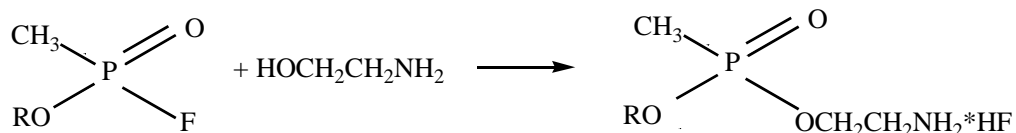
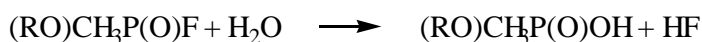
Название вещества	Зарин (фторангидрид изопропилового эфира метилфосфоновой кислоты, GB)	Зоман (фторангидрид пинаколилового эфира метилфосфоновой кислоты, GD)	Вещество типа VX (О-этиловый S-2-(N,N-диизопропиламино) этиловый эфир метилфосфоновой кислоты, VX)
Физические свойства	Жидкость без цвета и запаха; $T_{пл} = -57^{\circ}\text{C}$, $T_{кип} = 151,5^{\circ}\text{C}$ (с разл.), летучесть 11,3 мг/л (20°C); $d = 1,094$ г/мл; смешивается во всех отношениях с водой и орг. растворителями. Технический продукт представляет собой летучую жидкость с окраской от бледно-желтой до коричневой	Жидкость без цвета; $T_{пл} = -80^{\circ}\text{C}$, $T_{кип} = 190^{\circ}\text{C}$, $d = 1,013$ г/мл, летучесть 3 мг/л (20°C); плохо раств. в воде (1,5% при 20°C), легко – в спиртах, кетонах, сложных эфирах и алкилгалогенидах. Технический продукт соломенно-желтого цвета с запахом камфары	Бесцветная густая жидкость. $T_{пл} = -39^{\circ}\text{C}$, $T_{кип} = 298^{\circ}\text{C}$ (расч.), $d = 1,008$ г/мл, не перегоняется при атмосферном давлении. Летучесть 0,0105 мг/л (25°C). Гигроскопичен, ограниченно растворим в воде (около 5% при 20°C), хорошо – в органических растворителях
Химические свойства	Химически довольно устойчив. Реакционная способность зарина определяется его свойствами как фторангидрида достаточно сильной метилфосфоновой кислоты. Большинство реакций происходит с разрывом связи фосфор-фтор. Наиболее характерны реакции нуклеофильного замещения по положительному атому фосфора с потерей фтора	По структуре аналогичен зарину, поэтому реакции, в которые вступает зоман, свойственны и зарину. Различие между ними состоит в том, что у зомана более разветвленная и объемная эфирная группа, за счет чего реакции протекают медленнее	Соединение химически очень устойчиво, хотя имеет несколько реакционных центров. Все реакции у VX происходят преимущественно в неводных средах и намного медленнее, чем у зарина и зомана. Наименее прочной в молекуле VX является связь фосфор-сера, которая ослабевает после присоединения электрофила к атому серы

Продолжение табл. 1

Отношение к гидролизу	Гидролизуется в нейтральных водных растворах с образованием изопропилового эфира метилфоновой кислоты и фтороводородной кислоты. Скорость гидролиза возрастает с повышением температуры и в щелочной среде по сравнению с кислой	Гидролиз происходит с образованием малотоксичного пинаколилового эфира метилфосфоновой кислоты или соответствующих солей этой кислоты. Гидролизуется медленно. Время гидролиза 7 на 50% при 30°C и рН 7 составляет 41 час. При рН>10 гидролизуется быстро	Очень устойчив к действию воды. Время разложения водой на 50% в нейтральной среде при 25°C составляет 350 суток и даже при рН=10 оно не менее 10 ч. Полное разложение достигается только при кипячении с концентрированными растворами щелочей (рН>12)
Физиологическое действие	Отравляющее вещество нервно-паралитического действия. При концентрации зарина в воздухе 0,0005 мг/л первые признаки поражения появляются через 2 минуты. Среднесмертельная доза в течение 1 мин при действии через органы дыхания составляет 0,075 мг/л, при действии через кожу - 0,12 мг/л. Полудетальная доза при пероральном введении - 0,14 мг/кг веса. ПДК в воде 5*10 ⁻⁵ мг/л, в почве 2*10 ⁻⁴ мг/кг, ОБУВ в атмосферном воздухе 2*10 ⁻⁷ мг/м ³ . По степени воздействия на организм относится к чрезвычайно опасным вредным веществам (класс опасности 1)	Отравляющее вещество нервно-паралитического действия. Первые признаки поражения наблюдаются при концентрациях около 0,0005 мг/л через минуту (сужение зрачков глаз, затруднение дыхания). Среднесмертельная доза при действии через органы дыхания составляет 0,03 мг•мин/л, смертельная концентрация при резорбции через кожу равна 2 мг/кг. ПДК в воде 5*10 ⁻⁶ мг/л, в почве 1*10 ⁻⁴ мг/кг, ОБУВ в атмосферном воздухе 1*10 ⁻⁷ мг/м ³ . По степени воздействия на организм относится к чрезвычайно опасным веществам (класс опасности 1)	Отравляющее вещество нервно-паралитического действия. При поражении появляется мышечное подергивание, затем судороги, мышечная слабость и паралич. Для человека полудетальная доза на кожу составляет 100 мкг/кг, перорально - 70 мкг/кг. Миоз наступает при концентрации 0,0001 мг/л через 1 минуту. По сравнению с другими фосфорорганическими ОБУВ обладает очень высокой кожно-резорбтивной токсичностью. ПДК в воде 2*10 ⁻⁶ мг/л, в почве 5*10 ⁻⁵ мг/кг, ОБУВ в атмосферном воздухе 5*10 ⁻⁸ мг/м ³ . По степени воздействия на организм относится к чрезвычайно опасным веществам (класс опасности 1)

Химические свойства, характерные для рассматриваемых фосфорорганических отравляющих веществ, определяют пути их детоксикации. Основным путем деструкции ФОВ является гидролиз, но разработаны способы уничтожения ФОВ посредством окисления пероксидом водорода в присутствии карбонатов и молибдатов, а также фотохимическим путем [241, 304, 326].

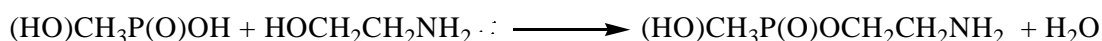
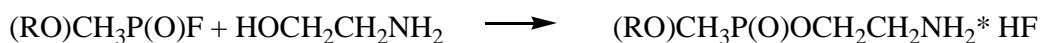
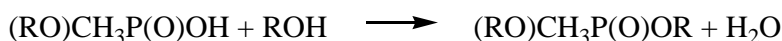
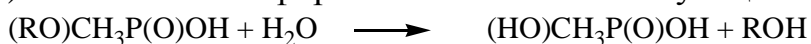
При взаимодействии зарина и зомана с водным раствором моноэтаноламина по реакции гидролиза образуются соответствующие кислые изопропиловый и пинаколиловый эфиры, в присутствии щелочи – их соли, а при алкоголизе – соответствующие смешанные аминоэфиры метилфосфоновой кислоты, в том числе в виде солей:



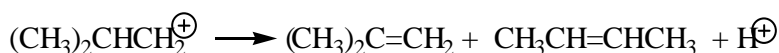
Эти реакции нуклеофильного замещения происходят достаточно легко в силу высокой полярности связи фосфора с атомом фтора. Однако по способности к реакциям с нуклеофилами зарин и зоман различаются. Так как у зомана более разветвленная и объемная эфирная группа (пинаколиловая), это приводит к увеличению положительного индукционного эффекта и мезомерного р,π-эффекта сопряжения р-электронов RO-группы и π-электронов P=O связи. Эти электронные взаимодействия уменьшают недостаток электронной плотности на фосфоре, а это ведет к снижению скорости реакций зомана с нуклеофильными реагентами: водой (гидролиз), аммиаком и аминами, гидроксиламином и этаноламином, спиртами и фенолами.

Кроме того, скорость этих реакций могут увеличивать гидроксокомплексы ионов металлов, в том числе марганца и меди (например, их содержание в почвах Щучанского района Курганской области повышено). Они оттягивают электроны от атома кислорода и фтора одновременно, увеличивая положительный заряд на фосфоре и облегчая атаку различных оснований.

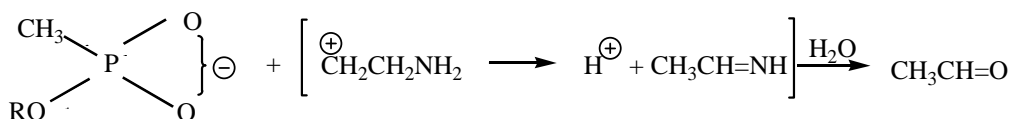
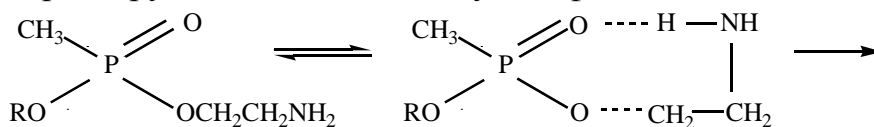
В кислых природных средах (особенно при повышенной температуре) могут идти реакции гидролиза эфиров с образованием МФК, этерификации и переэтерификации с образованием кислых, средних (изопропилового и пинаколилового) и смешанных эфиров МФК и соответствующих спиртов:



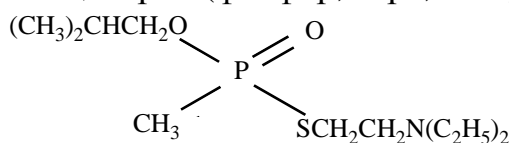
При действии на образовавшиеся кислые, средние эфиры (равно как и на зарин, зоман) температур выше 100-150°C возможно термическое разложение этих соединений с разрывом эфирных связей O-C и с образованием алкенов, фтористых алкилов (изопропила и пинаколила), которые в свою очередь являются реакционноспособными соединениями.



Для образовавшегося смешанного эфира при нагревании может идти реакция термораспада с образованием кислого эфира и этилиденимина, который может превращаться в циклический тример или гидролизироваться до уксусного альдегида, реагирующего с любыми нуклеофилами:



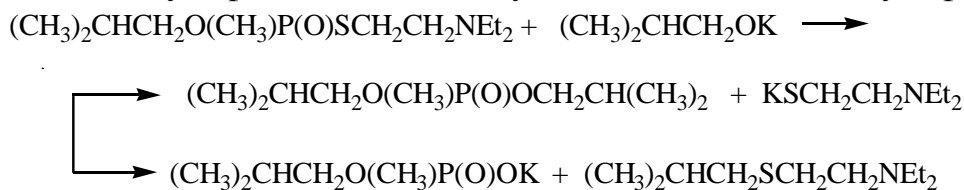
VX - химически более устойчивое вещество, чем зарин и зоман, хотя и имеет несколько реакционных центров (фосфор, сера, азот):



Электрофильность атома фосфора сильно понижена в силу большого объема и значительно меньшей электроотрицательности группы SCH₂CH₂NR₂ по сравнению с атомом фтора. Поэтому все реакции с нуклеофилами проходят намного медленнее, чем у зарина и зомана, причем преимущественно в неводных средах, т.е. вещество типа VX очень устойчиво к действию воды. Нуклеофильные вещества реагируют с VX в водной среде настолько медленно, что эти реакции не имеют практического значения, а значит, в природной среде VX может сохраняться достаточно долго.

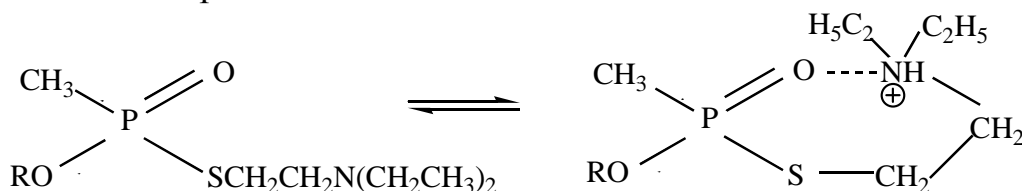
Однако в неводных средах нуклеофильные реакции идут достаточно легко с разрывом P-S связи, а при pH ≥ 10 возможен отрыв эфирной группы. По технологии обезвреживания детоксикацию VX проводят в безводной среде изобутилатом калия (алкоголиз) в среде изобутанола и N-метилпирролидона, при этом нуклеофильные реакции идут достаточно легко с разрывом P-S связи

и образованием среднего диизобутилового эфира и калиевой соли кислого изобутилового эфира МФК, соответствующих серосодержащих соединений – диэтиламиноэтилсульфида калия и изобутилдиэтиламиноэтилсульфида:



Окисление диэтиламиноэтилмеркаптана, образовавшегося в воде из $(\text{CH}_3\text{CH}_2)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{SK}$, может привести к образованию в природных средах диэтиламиноэтилдитиана $\text{Et}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{S-SCH}_2\text{CH}_2\text{N Et}_2$. Аналогичные соединения являются весьма токсичными.

В VX может проходить внутримолекулярное взаимодействие фрагмента $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{NEt}_2$ с кислородом $\text{P}=\text{O}$:



Это приведет к образованию изобутилового и смешанного эфиров метилтиофосфоновой кислоты $(i\text{-BuO})\text{CH}_3\text{P}(\text{O})\text{SH}$ и $(i\text{-BuO})\text{CH}_3\text{P}(\text{S})\text{OH}$ с последующей этерификацией и переэтерификацией с природными спиртами.

Кроме реакций с нуклеофилами ви-икс может выступать как основание по атому азота и как нуклеофильный реагент по атому серы: с кислотами (в том числе и органическими в природных средах) VX будет легко образовывать хорошо растворимые в воде аммониевые соли, а с электрофильными реагентами - сульфониновые производные с сильно полярной легко разрывающейся P-S связью.

1.5. Особенности биотрансформации метилфосфонатов

Многотоннажное производство фосфонатов и их широкое использование, а также уничтожение химического оружия с образованием огромной массы фосфонатов в качестве отходов могут приводить к появлению этих ксенобиотиков антропогенного происхождения в природных средах, как правило, в малых дозах.

Действие биологически активных веществ в малых концентрациях или дозах хотя и известно издревле как гомеопатия, но долгое время просто игнорировалось, а работы в этой области объявлялись лженаучными [96]. Нашумевшие материалы по изучению эффекта сверхмалых доз (СМД) были опубликованы в 1988 году Жаком Бенвенистом [308], который за исследования по во-

просам «памяти воды» и «передачи биоинформации» в 1991 и 1998 годах был отмечен антинобелевской премией (Ig® Nobel Prize).

Однако в то время незамеченными остались работы Г.Н. Шангина-Березовского по токсичному действию некоторых мутагенов в ультрамалых дозах [273, 274]. Это научное направление в России получило свое развитие только после 2000 года [23, 54, 58, 115, 137].

Чрезвычайно интересное, но не получившее должного внимания исследование по воздействию на крыс ОВ вещества типа ви-икс в СМД (10^{-7} М, 10^{-13} М и 10^{-31} М) было опубликовано Л.П. Точилкиной в журнале «Химическая и биологическая безопасность» в 2007 году [248].

Это исследование показывает, что выявление биологической активности для таких опасных химических веществ, как ОВ, равно как и для других поллютантов антропогенного происхождения, предъявляет особые требования к организации химических производств, технике безопасности и гигиене труда. Это связано с качеством жизни людей в условиях загрязнения окружающей среды загрязняющими веществами в количествах, не поддающихся обнаружению даже современными методами химико-аналитического контроля.

Считается, что основными продуктами спонтанной трансформации ФОВ в природных средах являются соответствующие эфиры метилфосфоновой кислоты, метилтиофосфоновой и метилпирофосфорной кислот, а также фтористый водород для зарина и зомана и диалкиламиноэтилмеркаптан, диалкиламиноэтилдитиан, диалкиламиноэтиловый спирт для VX. Перечисленные эфиры МФК в большинстве своем считаются нетоксичными или малотоксичными.

Однако для продуктов гидролиза VX американского производства диизопропиламиноэтилдитиана и диизопропиламиноэтилметилтиофосфоната выявлена высокая степень токсичности [228]. Данные по токсичности аналогичных продуктов распада российского VX - диэтиламиноэтилдитиана, диэтиламиноэтилметилтиофосфоната - отсутствуют. Поэтому в силу того, что токсичность некоторых веществ в составе реакционных масс после детоксикации вещества типа VX может быть высокой, дальнейшему обезвреживанию реакционных масс в настоящее время уделяется особое внимание. Так, авторы одной из последних работ [79] указывают, что для разложения фосфорорганических компонентов реакционных масс после уничтожения VX наиболее эффективны биокаталитические способы.

В настоящее время разработан модифицированный фермент His₆-ОРН (органопосфатгидролаза), способный катализировать гидролиз VX [77, 78, 80]. Кроме того, на основе иммобилизованных на геле поливинилового спирта клеток бактериальной культуры *Pseudomonas sp.* разработан биокатализатор [79, 264, 294], способный осуществлять деградацию метилфосоновой кислоты в

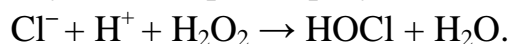
присутствии источника углерода с разрывом С—Р связи до фосфата, который используется клетками как источник фосфора.

Проблема трансформации фосфорорганических соединений в окружающей природной среде на сегодняшний день изучена недостаточно и требует серьезных научных исследований по выявлению промежуточных и конечных продуктов деструкции и трансформации, их химических и токсикологических свойств. Появление фосфонатов как ксенобиотиков в природных средах в малых дозах вызывает необходимость детального изучения влияния этих веществ на живые организмы, в том числе на теплокровные, так как фосфонаты сами оказывают влияние на метаболические процессы, а также реагируют с другими субстратами клетки, образуя новые соединения с различной биологической активностью.

Ряд исследований по биоремедиации почв от ФОС показывает, что существуют микроорганизмы, использующие С-Р-лиазный ферментный комплекс для расщепления связи С-Р [122, 128, 152]. Имеются данные, что некоторые ФОС, например, аминоксенофосфонаты, найдены в природе [310, 315, 321].

Метилфосфоновая кислота и ее соли (метилфосфонаты), кислые эфиры и средние эфиры (моноалкилфосфонаты и диалкилметилфосфонаты) как основные многотоннажные продукты разложения ФОВ являются достаточно устойчивыми соединениями [171, 192] и обнаруживаются спустя 10 лет после загрязнения на полигоне Дагуэй (США) [122, 228, 318].

Для МФК установлена низкая токсичность для млекопитающих и водных организмов, ЛД₅₀ для крыс составляет $5 \cdot 10^3$ мг/кг при пероральном введении [318]. Однако устойчивая малополярная С—Р связь этого соединения способна расщепляться в определенных условиях по гомолитическому механизму [228] с образованием свободных радикалов, которые могут реагировать с другими радикалами как «ловушки», с различными субстратами по цепному механизму, с активными формами кислорода с образованием более токсичных соединений. Например, в обзоре [185] описаны пути образования гипохлорита и механизм гипохлоритиндуцированного перекисного окисления липидов (ПОЛ), согласно которому гипохлорит образуется по схеме:



МФК может ионизироваться как сильная кислота и распадаться гомолитически по схеме:



Образовавшиеся метильный CH_3^\bullet и фосфонатный $\bullet\text{P}(=\text{O})(\text{OH})\text{O}^-$ радикалы могут реагировать с гипохлоритом с образованием более токсичных продуктов, чем сама МФК, хлорметана и хлорангидрида: CH_3Cl и $\text{Cl}-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})_2$. При окислении МФК активными формами кислорода до фосфорной кислоты CH_3-

фрагмент может окислиться до метанола и еще более токсичного и несравнимо более реакционного формальдегида.

Появление всех перечисленных токсичных частиц и молекул может привести к окислительному стрессу в организме и множеству патологических процессов в белковом, липидном и углеводном обменах.

В литературе имеются данные об исследованиях влияния метилфосфоновой кислоты на дикорастущие растения, ячмень, пелюшку [177, 178], мхи [237], некоторые тест-организмы [177], но материалов о влиянии МФК на теплокровных животных до 2007 года не было.

Начиная с 2007 года в аккредитованной на техническую компетентность при выполнении биохимических анализов лаборатории экотоксикологии Регионального центра по обеспечению экологического мониторинга объектов по уничтожению химического оружия по Курганской области проводится изучение биохимических показателей крови лабораторных мышей с целью выявления закономерностей их изменения после воздействия на организм животного специфических загрязняющих веществ [125, 150, 194-200, 229, 230].

Таким образом, уникальное строение фосфонатов, особая реакционная способность, возможность прямого и опосредованного действия на системы метаболизма клеток и тканей, малая изученность влияния на теплокровные организмы и широкое применение производных МФК в различных сферах деятельности, а также процесс уничтожения химического оружия и связанная с ним проблема утилизации и захоронения отходов, появление в компонентах природной среды этих ксенобиотиков делают изучение воздействия фосфонатов на метаболизм теплокровных организмов крайне важным и актуальным.

1.6 . Некоторые аспекты защитных и детоксикационных механизмов организма на воздействие ксенобиотиков

Воздействие ксенобиотиков различного типа всегда приводит к дисбалансу биохимических реакций и активированию защитных и детоксикационных систем организма.

В настоящее время нет устоявшейся систематизации реакций защитных и детоксикационных систем организма на действие ксенобиотиков на уровне биохимического ответа. Больше всего работ посвящено системе перекисного окисления липидов [13, 31, 173, 247] и иммунной системе [287]; стали появляться работы, посвященные антиоксидантной защите или антиоксидантной системе (АОС) [21, 70-72, 92-94, 159, 160], эндогенной интоксикации (ЭИ) [12, 46, 61, 118, 151, 181, 183, 239] и влиянию ксенобиотиков на биоэнергетические процессы [130, 138, 176].

Во взаимосвязи «детоксикация ксенобиотиков - защитные механизмы – биохимические показатели» определяют маркеры эндогенной интоксикации организма, характеризующие детоксикационную систему белков, показатели антиоксидантной системы, связанной с окислительно-восстановительными процессами и действием свободных радикалов, и биоэнергетической системы – системы субстратов и ферментов, участвующих в обеспечении энергией процессов биотрансформации и детоксикации.

Для компенсации вредного воздействия токсикантов – ксенобиотиков и активных эндометаболитов - в организме существует защитная система стрессовых ответов. При этом клетки синтезируют в большом количестве специфические стрессовые белки, в функции которых входит поддержание клеточного гомеостаза в условиях изменения окружающей среды клетки [56]. Важнейшей группой этих белков являются белки теплового шока (шапероны), которые стабилизируют неустойчивые формы других белков [309], а также участвуют в индуцированных стрессом иммунных ответах [317].

Важнейшими белками гуморального иммунитета являются белки-глобулины, состоящие из нескольких фракций разной подвижности в электрическом поле – α 1-, α 2-, β - и γ -глобулины, каждая из которых содержит несколько белков, в разной степени участвующих в антистрессовых реакциях организма. Так, белки фракции α 2-глобулинов (это α 2-макроглобулин - ингибитор протеиназ; гаптоглобин - белок острой фазы воспаления, уровень которого увеличивается до 3 раз при инфекционных процессах; церулоплазмин – оксидаза аскорбиновой кислоты, адреналина, диоксифенилаланина, инактиватор свободных радикалов; С-реактивный белок – главный медиатор воспаления) могут указывать на протекание эндогенной интоксикации [110, 155, 167, 243, 275, 292].

Фракция γ -глобулинов – совокупность иммуноглобулинов Ig G, A, M, D, E - является маркером состояния иммунной системы, которая у млекопитающих организована достаточно сложно. При гипер- γ -глобулинемии иммунная система распознает и разрушает попавшие в организм чужеродные макромолекулы, как правило белковой природы, такие как микроорганизмы и вирусы. Гипо- γ -глобулинемия характерна при иммунодефиците [55, 56].

Для сывороточного альбумина – регулятора коллоидно-осмотического давления плазмы, быстро реализуемого резерва белка и транспортного средства – последняя функция является наиважнейшей. Сывороточный альбумин способен взаимодействовать с молекулярного и ионного типа многочисленными эндогенными и экзогенными соединениями: гормонами, жирными и желчными кислотами, билирубином, ионами хлора и кальция, биологически активными лекарственными и токсическими веществами, обеспечивая их транспорт и распределение в тканях организма [110]. Конъюгирующие свойства альбумина

связаны с большой общей площадью поверхности молекул и наличием в них химически активных групп различного строения. Однако альбумин как белковую молекулу с большим содержанием реакционноспособных SH-групп и дисульфидных связей многие физиологически активные вещества, в том числе специфические токсиканты, способны инактивировать. Таким образом, с одной стороны, альбумин может сам активно разносить молекулы-токсиканты по всему организму, с другой стороны, в условиях гипоальбуминемии увеличивается содержание свободных, биологических активных и токсических форм. К гипоальбуминемии могут приводить и токсиканты с антихолинэстеразной активностью, так как синтез сывороточного альбумина регулируется ферментами печени, в том числе холинэстеразами [263].

Из изложенного следует, что содержание альбумина и соотношение альбумина к глобулину могут служить хорошими диагностическими тестами при различных интоксикациях, в том числе ФОС.

Процесс нормального обмена веществ и интоксикации сложных молекул может способствовать избыточному накоплению в тканях и биологических жидкостях эндогенных токсических молекул меньшего размера – среднемолекулярных токсинов (СМТ). Это приводит к развитию эндогенной интоксикации [181, 183]. Как специфические маркеры уровня эндотоксемии в клинико-биологических исследованиях определяют вещества низкой и средней молекулярной массы (ВНСММ) или средние молекулы, среди них выделяют олигопептиды (ОП), которые еще называют среднемолекулярными пептидами (СМП) [110, 111].

СМТ - это группа различных по своей химической природе веществ, объединенных практически только по одному свойству – молекулярной массе, которая составляет от 300 до 5000 дальтон. ВНСММ (их насчитывают около 200) – это пептиды, эндорфины, аминоксахара, полиамины, многоатомные спирты, инсулин, глюкагон, витамины, нуклеотиды, олигосахариды, производные глюкуроновых кислот, креатинин, мочевины, альдегиды, билирубин, аминокислоты, этанол, аммонийные соли и другие [41, 144-147, 188]. В настоящее время считается, что продукты белкового катаболизма составляют до 80% фракции ВНСММ, а 20% - биологически активные вещества и соединения промежуточного обмена [244]. Причинами накопления содержания СМТ в сыворотке крови являются следующие: усиленное образование их за счет появления избыточного количества физиологических метаболитов [246]; неполный катаболизм ВНСММ при хронической почечной недостаточности [41]; массивное разрушение эндотелия и выход содержимого клеток в кровяное русло [168]. Дегградация белковых веществ, в том числе при перекисном повреждении, также приводит к образованию ОП наряду с другими токсическими фрагментами [254, 278].

К группе ОП (СМП) относят совокупность пептидов, являющихся тканевыми гормонами, например, окситоцин, вазопрессин, эндорфины, энкефалины, ангиотензин [325] и недостаточно изученную группу нерегуляторных пептидов. ОП могут выступать в роли иммунодепрессантов, влиять на процессы тканевого дыхания, подавляя способность аккумулировать и трансформировать энергию [63, 113], взаимодействовать с компонентами гомеостаза [286], изменять проницаемость мембран и подавлять активность ряда ферментов [35].

СМТ вызывают интерес исследователей как универсальные факторы интоксикации [118]. Имеющиеся литературные данные указывают на их участие в угнетении тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования, ингибировании АТФ-азной активности и синтеза ДНК, нарушении утилизации глюкозы [124, 183]. Изучено участие средних молекул в развитии вторичной иммунодепрессии; их подавляющее действие на функциональную активность лейкоцитов; обнаружено ингибирующее действие на эритропоэз и синтез гемоглобина. Многие из ВНСММ обладают нейротоксической активностью; угнетают биосинтез белка и активность ряда ферментов, нарушают механизмы регуляции синтеза адениловых нуклеотидов; изменяют транспорт ионов через мембраны [144]. Среднемолекулярные пептиды способны соединяться и блокировать рецепторы любой клетки, неадекватно влияя на её метаболизм и функции [41, 71, 144, 151].

Токсическое действие СМТ объединяют в синдром эндогенной интоксикации [44]. Баланс содержания ВНСММ и ОП в плазме, эритроцитах и моче может дать информацию о степени выраженности ЭИ, соответствующей уровню метаболических сдвигов. Развитие эндогенной интоксикации независимо от этиологического фактора характеризуется различным распределением ВНСММ в биологических субстратах [42, 124, 146]. Содержание средних молекул (ВНСММ и ОП) сегодня обычно определяют в плазме, эритроцитах и моче по методу Н.И. Габриэляна [47] и М.Я. Малаховой [144, 148]. Распределение этих веществ в биологических субстратах носит фазовый характер и дает точную оценку функционирования систем и органов при детоксикации [124, 146].

Особенности функционирования АОС рассмотрены в многочисленных монографиях и обзорах [3, 33, 34, 70, 94, 114, 306]. Попытка классифицировать подходы к изучению АОС осуществлена Е.Е. Дубининой [71].

Так, в зависимости от химического строения из компонентов АОС можно выделить основные – высокомолекулярные белки и низкомолекулярные липиды. Специфическое направление действия АОС - непосредственное снижение уровня оксидантов путем разрушения и связывания активных форм кислорода или радикалов, приводящее к обрыву цепных свободно-радикальных реакций. Другими направлениями работы АОС являются: снижение возможности до-

полнительной генерации свободных радикалов; связывание металлов переменной валентности (железа, меди), что исключает возможность их участия в свободно-радикальных реакциях [285, 305, 306]. В зависимости от характера действия выделяют компоненты АОС: ферментативные – супероксиддисмутаза (СОД), каталаза, глутатионпероксидаза и неферментативные – витамины Е, К, С, трансферрин, церулоплазмин, билирубин, мочева кислота, SH-аминокислоты, глутатион, альбумин.

Ксенобиотики в организме подвергаются метаболическим превращениям или биотрансформации (биodeградации, детоксикация). Биотрансформации ксенобиотиков – механизм поддержания гомеостаза во время воздействия на организм чужеродных соединений. Целью этого процесса, в котором участвуют в основном печень, а также легкие, почки, кишечник, кожа, селезенка, является превращение исходного токсиканта в форму, наименее токсичную и наиболее легко удаляемую из организма. Однако биотрансформация ксенобиотиков далеко не всегда приводит к их дезактивации, характерными являются и пути активации, приводящие к повышению токсичности [57].

В современном представлении в биотрансформации принято выделять два этапа (две фазы) метаболических превращений чужеродных соединений. На первом этапе происходит гидрокселирование – ферментативные гидролитические или окислительно-восстановительные превращения молекул ксенобиотиков, приводящих к образованию в структуре, как правило, -ОН-групп, а также -NH₂, -SH, -COOH, что увеличивает гидрофильность, а значит, растворимость и способность к экскреции исходного соединения.

Второй этап одними авторами называется этапом конъюгации (взаимодействие с белками, аминокислотами, глюкуроновой и серной кислотами) [57, 176], другими - этапом синтетических превращений (глюкуронидация, метилирование, связывание с глутатионом) [133]. Предполагается, что первоначальное упрощение структуры (деградация) сопровождается структурным усложнением (синтезом, конъюгацией). Однако логичней было бы говорить о двух вариантах протекания второго этапа. Один – конъюгация (соединение двух подобных) – взаимодействие с относительно сложными молекулами – белками, глутатионом, аминокислотами, глюкуроновой кислотой (глюкуронидация, глюкуронидирование) – с образованием более сложных производных; а другой – синтетических превращений – взаимодействие с простыми молекулами (сульфирование, метилирование, ацетилирование и другие), приводящее к несложным производным. Большинство ферментов этого этапа локализовано в цитозоле.

С точки зрения энергозатрат первый этап – ферментативные реакции, протекающие с затратой необходимой для этого энергии; второй этап – реакции, не требующие использования основных энергетических ресурсов клетки.

На первой ферментативной стадии биотрансформации чужеродных для организма веществ многие реакции катализируются ферментными системами. Основное значение в метаболизме чужеродных веществ играет эндоплазматическая сеть клеток печени, для которой характерна высокая ферментативная активность. В самом общем виде детоксицирующий цикл можно представить в следующем виде: попавшие в организм экзогенные чужеродные вещества (RH) соединяются с альбумином (А) в комплекс (RHA) и транспортируются в печень. Кроме того, одним из важнейших свойств компонентов самой монооксигеназной системы, в частности цитохрома P450, является способность к индукции под действием внешнего фактора, в роли которого могут выступать ксенобиотики, а также физические воздействия и стресс [176].

Главная ферментативная реакция детоксикации в печени — окисление ксенобиотиков на цитохроме P-450 в мембранах эндоплазматической сети (хотя определенная часть ксенобиотиков может попадать в печень в свободном виде) и образование нового комплекса (ROHA) [30, 149]. Окисленный ксенобиотик в виде (ROH) также может удаляться через экскреторные органы. Апофермент цитохрома P450 (или CYP) с регуляторной функцией может связывать сотни самых различных соединений, а гем в составе окислительно-восстановительной цепи для реакций окисления переводит молекулярный кислород из неактивной формы в активную. Цитохромы P450 катализируют самые разные типы реакций для алифатических (даже для простых алканов типа гексана) и ароматических (даже для полиароматических) соединений, а именно: гидроксирование атомов углерода, серы, азота, эпоксидирование двойной связи, перенос окисленной группы, разрушение эфирной связи, дегидрогенирование [64, 65].

В микросомальной фракции гепатоцитов с участием фермента цитохром-с (или b-)-редуктазы могут протекать реакции восстановления органических нитро- азо-, галогенсодержащих ароматических и алифатических ксенобиотиков. Существуют многие ферментные системы, содержащиеся в растворимой фракции гомогенатов печени, почек и легких, которые также катализируют реакции окисления, восстановления и гидролиза некоторых токсичных веществ, например спиртов, альдегидов и кетонов (алкогольдегидрогеназа).

Некоторые ксенобиотики, мало подверженные гидроксированию, например, 2,3,7,8-тетрахлордibenзолдиоксин, с периодом полураспада в организме человека до года, являются канцерогенами и могут накапливаться в организме, приводя к раковым заболеваниям.

В результате биотрансформации могут образовываться так называемые «реактивные метаболиты» основного вещества, связанные с компонентами клеточных мембран, ферментами, основаниями нуклеиновых кислот и др., которые утратили свой действующий эффект, но при повторном поступлении ксенобио-

тика (токсиканта, лекарственного препарата, например, парацетамола, карбамазепина, фенобарбитала, димедрола) они накапливаются и вызывают повреждение печени и других органов [57].

На втором этапе биотрансформации может протекать биоактивация ксенобиотиков. Поэтому особенно важным является изучение метаболических процессов, в результате которых нетоксичное или малотоксичное вещество, которое было исходным ксенобиотиком или образовалось при гидроксилировании на первом этапе, превращается в соединение более токсичное, чем исходное.

Например, токсичность метилового спирта определяется продуктами его окисления - формальдегидом и муравьиной кислотой; метаболизм этилового спирта начинается под действием алкогольдегидрогеназы с образования значительно более токсичного ацетальдегида, этиленгликоля - щавелевой кислоты; винилхлорид метаболически переходит в окись, которая затем превращается в хлорацетальдегид – мутаген, действующий непосредственно на ДНК. Известный инсектицид тиофос (паратин), который не обладает антихолинэстеразной активностью *in vitro*, в организме изомеризуется в мощный ингибитор холинэстеразы - оксоформу (параоксон или оксофос) [134]. В некоторых случаях даже глюкуронидация, представляющая собой детоксикационный процесс, может усилить токсичность ксенобиотика: так, образовавшиеся после глюкуронидации ароматических аминов N-гидроксиметаболиты легко гидролизуются в кислой среде до канцерогенных N-гидроксиариламинов.

При детоксикации любых органических ксенобиотиков на стадии окисления может возникнуть дисбаланс между образованием окисленных форм и наличием достаточного количества антиоксидантов, приводящий к окислительному стрессу [57]. Окислительный стресс может вызывать повреждение клеток за счет непосредственного взаимодействия с окислителем, а также за счет цепного нерегулируемого образования более токсичных метаболитов. Окислительный стресс напрямую связан с кислородом – около 90% потребляемого организмом кислорода восстанавливается в дыхательной цепи митохондрий по схеме:



В условиях окислительного стресса образуются различные активные формы кислорода (АФК). Так, электрон с семихинона коэнзима Q-убихинона может передаться не по цитохромной цепи, а на молекулярный кислород [56], что приводит к одно-, двух- трехэлектронному восстановлению кислорода с образованием супероксид-анион-радикала, а далее – перекиси водорода, гидропероксидного и гидроксильного радикала. Кислород может также переходить в одну из самых активных форм АФК - в возбужденное синглетное состояние. Все АФК могут взаимодействовать с различными тканями и биомолекулами [312, 324]. Супероксидный анион-радикал может свободно мигрировать от мес-

та своего образования через мембраны по анионным каналам, что обеспечивает его широкую распространенность в компартментах клетки [93]. В норме все АФК участвуют в аэробных процессах в организме. Однако при окислительной нагрузке (действии ксенобиотиков) контроль со стороны эндогенных антиоксидантов нарушается, и АФК начинают участвовать в различных повреждающих клетку реакциях с образованием свободных радикалов по общей схеме: $A^{\bullet} + RH \rightarrow AH + R^{\bullet}$. Такие радикальные процессы характерны для всех биомолекул, в том числе для нуклеиновых кислот, белков, липидов [312].

Взаимодействуя с липидами по механизму пероксидирования (перекисного окисления, ПОЛ), радикальные частицы способствуют образованию гидроперекисей жирных кислот, что приводит к структурной и функциональной перестройке мембран. В результате увеличивается проницаемость мембран для ионов H^+ , K^+ , Na^+ , Ca^{2+} с последующим пространственным разобщением окислительных цепей, формируется синдром цитолиза, а в ряде случаев инициируется самопереваривание клеток (мембрана разрывается с выходом внутриклеточных протеолитических ферментов и клетка погибает). Важной особенностью ПОЛ является способность к аутокаталитическому самоускорению при наличии благоприятных условий. Известно, что факторы, поддерживающие структурированность липидов (например, холестерин), тормозят перекисное окисление [13, 31, 66].

При окислении белков происходит модификация аминокислотных фрагментов с образованием карбонильных групп, потеря сульфгидрильных групп, разрыв дисульфидных мостиков, что может приводить к нарушению третичной и вторичной структуры белков и разрыву полипептидных цепей.

Повреждение ДНК может происходить путем присоединения, например, гидроксильного радикала по двойной связи аденина и гуанина с образованием оксоформы по имидазольному циклу. Если окислительные повреждения не исправляются, то это приводит к мутагенным эффектам.

У клеток имеется достаточно защитных механизмов, чтобы предотвращать или устранять повреждения, возникшие за счет окислительных процессов. Это ферменты супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионовая система, витамины Е (α -токоферол), С (аскорбат), А (ретинол), стероидные гормоны, тироксин, фосфолипиды, холестерин, ремонтные системы ДНК, поврежденные белки.

Для изучения влияния ксенобиотиков на АОС в качестве маркеров можно использовать: 1) первичные субстраты окисления ПОЛ – содержание общих липидов, холестерина; 2) первичные, промежуточные и конечные продукты ПОЛ – диеновые конъюгаты, малоновый диальдегид (МДА), шиффовы основания; 3) ферментные системы – СОД, каталазу, глутатионпероксидазу; 4) эндо-

генные антиоксиданты, содержание которых может дать представление о длительности и глубине протекания процессов ПОЛ [13, 31, 110, 167].

Все протекающие процессы в клетке являются энергозависимыми. Химические вещества в целом и ксенбиотики в частности способны влиять на процессы тканевого дыхания и энергетического обмена в клетке. С другой стороны, биоэнергетическая система участвует в метаболизме (биотрансформации, детоксикации) чужеродных веществ.

Углубленные исследования нарушений биоэнергетики клетки начаты одним из основателей токсикологии Н.С. Правдиным, доказавшим, что показатели газообмена обладают высокой чувствительностью при воздействии на организм токсических агентов [202, 203]. В 1970-80 годы Б.А. Курляндским и Ю.С. Ротенбергом проводились исследования динамики кислорода в тканях по показателю напряжения кислорода (pO_2) [130, 221, 222].

На современном уровне идут исследования молекулярных механизмов влияния токсических веществ на электронно-транспортную цепь биологического окисления *in vitro* в изолированных митохондриях [162, 163, 182, 260]. Для многих неорганических и органических веществ [131, 140, 141, 176] уже изучены механизмы токсического действия на биоэнергетические процессы и найдены некоторые закономерности [76, 162, 223-225, 238, 259].

Так, многие чужеродные вещества могут влиять на биоэнергетические процессы как ингибиторы тканевого дыхания, воздействуя на различные системы ферментов: ферменты тканевого дыхания на стадиях, предшествующих циклу Кребса, ферменты цикла Кребса и дыхательной цепи митохондрий. При этом вещества – доноры и акцепторы радикалов или электронов (это могут быть и ФОС) могут нарушать транспорт электронов в энергетической цепи, в том числе за счет уменьшения активности железосодержащих ферментов. Интоксикация, приводящая к дефициту субстратов окисления (например, фтором), снижает утилизацию кислорода тканями и повышает его содержание в крови, приводя к гипоксии гистологического типа.

Другая часть ксенобиотиков (прежде всего ФОС и фосфорорганические инсектициды), обладающих активностью в отношении биологических мембран клетки, действует на биоэнергетический комплекс митохондрий опосредованно. У инсектицидов это связано с высокой липофильностью, активным окислением с образованием свободных радикалов и интенсификацией ПОЛ. Для клетки активация ПОЛ приводит к нарушению функционирования мембран [34, 53, 207], а активация окисления липидов митохондрий ведет к нарушению их энергетической функции с последующим развитием тканевой гипоксии [126]. Для ФОС, таким образом, характерно не только специфическое антихолинэстеразное действие, но и взаимодействие ФОС с рядом ферментов, непосредственно участвующих

щих в процессах тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования митохондрий – АТФаза, цитохромоксидаза, сукцинатдегидрогеназа [207, 221]; отмечается, что наиболее чувствительным звеном воздействия фосфорорганических инсектицидов является окисление НАД-зависимых субстратов. Этот механизм ингибирующей активности установлен для различных по строению и токсичности ФОС (фосфакола, армина, флорофоса, паратиона и др.) [221].

Некоторыми авторами отмечается, что для токсических агентов при действии малых доз не наблюдается разобщения окисления и фосфорилирования, а основные изменения связаны с увеличением скорости гликолиза и гликогенеза как биоэнергетических процессов [47, 176].

В качестве доступных маркеров биоэнергетических процессов могут выступать углеводы как один из главных источников энергии, их метаболиты и ферменты. Интересным для изучения в этом плане является гликоген, снижение синтеза которого происходит при паталогических процессах в печени с нарушением ее гликоген-образовательной функции. При недостатке гликогена тканевая энергетика переключается на жировой обмен, что требует много кислорода (в противном случае в избытке накапливаются кетоновые тела и наступает интоксикация), и белковый обмен, что ведет к потере пластического материала [189]. К кислородной недостаточности наиболее чувствительны центральная нервная система, мышца сердца, ткани почек, печени.

Таким образом, маркерами состояния гомеостаза организма при воздействии метилфосфонатов как ксенобиотиков особого строения могут выступать показатели белкового, липидного и углеводного обменов в совокупности со специфическими показателями системы окислительного стресса, детоксикационной, антиоксидантной и биоэнергетической систем.

Глава 2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ВЛИЯНИЯ МЕТИЛФОСФОНОВОЙ КИСЛОТЫ НА ПОКАЗАТЕЛИ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ МЕЛКИХ ГРЫЗУНОВ

Изучение влияния МФК осуществляли путем комплексного исследования, включающего экспериментальные, биохимические и статистические методы обработки данных.

Экспериментальные исследования проведены на здоровых взрослых половозрелых лабораторных мышах (самцах и самках) линии СВА в возрасте 2-3-х месяцев массой от 22 до 30 г с интервалом массы животных в сериях опытов ± 2 г.

Материалом исследования служили: мышечная ткань, печень, сыворотка и плазма крови, эритроцитарная масса крови. В ходе выполнения исследования применялись биохимические и статистические методы.

Лабораторные мыши содержались в стандартных условиях вивария согласно «Санитарным правилам по устройству, оборудованию и содержанию экспериментальных биологических клиник» от 06.01.73 г. и приказу № 63 Минздрава СССР от 10.03.1966 г. «О нормах кормления лабораторных животных и продуцентов» [233]. Интактные, опытные и контрольные группы мышей содержались в стандартизированных условиях одного вивария в однотипных изолированных друг от друга клетках, одновременно получали сбалансированное питание (зерновые смеси, крупы, корма животного происхождения и корнеплоды) и воду в достаточном количестве [85].

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» [156, 249], «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации» (приказ МЗ РФ № 267 от 19.06.2003 г.) [204] и «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ МЗ № 755 от 12.03.1977 г.) [205].

В экспериментальных исследованиях опытным группам лабораторных мышей инсулиновым шприцем проводили инъекции объемом 0,04 мл изотонических растворов МФК, нейтрализованных водным раствором гидроксида натрия до pH 7, под кожу живота сбоку (подкожно) или в мышцу бедра (внутримышечно). Контрольным группам мышей в соответствующую область вводили физиологический раствор такого же объема. Инъекции проводили всегда в одно время - в период с 9 до 12 часов.

Эвтаназия осуществлялась методом декапитации, которая проводилась металлическими ножницами в соответствующее время с 9 до 12 часов. Для

осуществления эвтаназии натошак вечером предшествующего дня из клеток с мышами убирали корм.

Часть крови использовалась для определения гематологических показателей - числа эритроцитов, гематокрита, гемоглобина. Для получения плазмы и эритроцитарной массы цельную кровь сливали по промытой физиологическим раствором и гепарином стеклянной воронке в пластиковые пробирки Эппендорфа с одной каплей гепарина 5000ЕД/мл. Пробирки закрывали, перемешивали переворачиванием несколько раз, затем центрифугировали в течение 10 минут при 3000 об/мин для разделения плазмы и эритроцитарной массы. Сыворотку крови получали центрифугированием цельной крови при 3000 об/мин в течение 10 минут. Надосадочную жидкость (сыворотку) отбирали дозатором в пробирки Эппендорфа и хранили при температуре +5⁰С до момента анализа, который проводили в день декапитации мышей. Сразу после отбора крови после эвтаназии брали на анализ печень и скелетные мышцы правого бедра.

В основу биохимических исследований положены известные методы [19, 117, 136, 206, 243]. Адаптированные к задачам исследования методики приведены в данной главе.

Результаты исследований обработаны с применением непараметрических методов статистики для малых выборок. При исключении выбросов использовали метод Титъена-Мура, проверяя минимум и максимум значений выборки. Достоверность различий между двумя несвязанными выборками экспериментальных данных оценивали с использованием критериев для независимых выборок - Вилкоксона-Манна-Уитни (U) для числа наблюдений n от 12 до 40 (W-критерия Вилкоксона) или рандомизации – при n от 5 до 12. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез в данном исследовании принимали равным 0,05. Результаты анализов усредняли с помощью медианы, на основании которой считали различия в процентах (%) опытных и контрольных групп. Для графического отображения разброса данных использовали 25-й и 75-й процентиля [43, 48, 60].

Корреляционную зависимость между выборками, подчиняющимися нормальному распределению, оценивали по критерию Пирсона, не подчиняющимися закону распределения – по критерию Кендалла. Результаты корреляционного анализа представляли в виде коэффициента корреляции с уровнем значимости $p \leq 0,05$ и уравнения регрессии. Факторный анализ проводили методом главных факторов, метод оценки общностей использовали для анализа главных компонент. За основу брали корреляционную матрицу, выполненную из коэффициентов корреляции Пирсона или Кендалла в зависимости от закона распределения.

При статистической обработке результатов исследования был использован интегратор модульной программы AtteStat 1.0 для программы Microsoft Excel, разработанный И.П. Гайдышевым в лаборатории информационно-вычислительного центра ФГУН «РНЦ "ВТО" им. академика Г.А. Илизарова Минздравсоцразвития Российской Федерации».

2.1. Количественное определение содержания общего белка и белковых фракций в крови

Общий белок определяют спектрофотометрическим биуретовым методом Кингслея–Вейксельбаума, регистрация оптической плотности окрашенных белковых комплексов ионов меди (2+) с пептидными связями в щелочной среде осуществляется при длине волны 540 нм [206].

Среди белковых фракций спектрофотометрически определяют уровень альбумина, который при вычитании из содержания общего белка может дать оценку валового содержания глобулинов. Для детального определения α 1-, α 2-, β -, γ -глобулинов прибегают к методу электрофоретического разделения, например, в тонком слое агарозного геля под действием постоянного электрического тока.

Оборудование и реактивы

Оборудование. Спектрофотометр, весы аналитические, система электрофореза (PARAGON Beckman-Coulter), пластинки с агарозным гелем, аппликаторы, денситометр (APPRAISE).

Реактивы. Стандартный раствор белка 60 (70) г/л. *Реактив Бенедикта:* 0,15 г меди сульфата и 0,60 г калия виннокислого растворяют в 50 мл дистиллированной воды, приливают 30 мл 10% натрия гидроксида, добавляют 0,10 г калия йодистого и доводят дистиллированной водой до 100 мл. Буферные растворы, красители для электрофоретического разделения и окрашивания белковых фракций.

Ход определения

Определение общего белка

К 0,1 мл сыворотки крови добавляют 0,9 мл воды и 4 мл биуретового реактива. В контрольную пробирку приливают 1 мл воды и 4 мл биуретового реактива. Раствор хорошо перемешивают и через 15 минут фотометрируют на спектрофотометре при длине волны 540 нм. Параллельно проводят измерение в стандартной пробе, в которой вместо сыворотки берут 0,1 мл стандартного раствора белка.

Расчет содержания общего белка в г/л производят по формуле:

$$C_{OB} = \frac{E_{OB}}{E_{CT}} * C_{CT},$$

где C_{OB} , C_{CT} – концентрация общего белка в плазме и стандартном растворе в г/л соответственно; E_{OB} , E_{CT} – оптические плотности анализируемого и стандартного растворов в единицах оптической плотности соответственно.

Определение белковых фракций

На агарозную пластинку с помощью аппликатора наносят тонкими полосками разведенную буферным раствором плазму (сыворотку) объемом по 20 мкл. Ожидают 5 минут, затем полоской фильтровальной бумаги удаляют остатки растворов с пластинки. Наливают подготовленный буферный раствор в ванночку для электрофореза, погружают пластинку, закрепляя ее в специальные пазы. Ванну подключают к прибору, где в течение 30 минут через раствор проходит постоянный ток напряжением 100-200В. После изымают пластинку и фиксируют белковые фракции, обрабатывая раствором уксусной кислоты. Пластинку сушат до полного высыхания агарозного геля, далее окрашивают в ванне с красителем, отмывают остатки красителя спиртовыми растворами. После окончательной сушки прозрачную полимерную пластинку с полосками белковых фракций, окрашенных в синий цвет, устанавливают в денситометр. Производится определение процентного содержания каждой фракции в зависимости от интенсивности и ширины окрашенной полосы. Результат выдается денситометром в % либо в г/л, если вводится значение общего белка.

Таблица 2

Интерквартильные размахи значений для общего белка и белковых фракций в плазме крови белых лабораторных мышей контрольных групп

Пол особей	Общий белок, г/л	Альбумин, г/л	Сумма глобулинов, г/л	α 1-глобулины, г/л	α 2-глобулины, г/л	β -глобулины, г/л	γ -глобулины, г/л
Самцы	54÷63	27÷31	28÷34	5,2÷6,7	2,3÷3,5	12÷19	6,2÷12
Самки	55÷71	29÷50	23÷40	3,8÷7,3	2,4÷5,9	11÷17	5,1÷21

2.2. Количественное определение олигопептидов и веществ низкой и средней молекулярной массы в крови

Концентрация олигопептидов в плазме крови и эритроцитах является критерием оценки степени интоксикации организма. ОП определяют в плазме,

эритроцитной массе, а также в моче. Определение основано на осаждении крупномолекулярных белков трихлоруксусной кислотой (ТХУ) и спектрофотометрическим определением по методу Лоури (основанным на реакции полифенольных веществ (ароматических аминокислот) с реактивом Фолина-Чокальтеу) окрашенных комплексов при длине волны 750 нм.

Вещества низкой и средней молекулярной массы определяют в супернатанте после осаждения крупномолекулярных белков плазмы раствором ТХУ путем регистрации спектра поглощения исследуемого раствора в зоне ультрафиолета в диапазоне 238-298 нм с шагом в 1 или 4 нм на УФ - спектрофотометре по методу М. Я. Малаховой [144, 206].

Оборудование и реактивы

Оборудование. Установка для перегонки, центрифуга, весы аналитические, спектрофотометр с диапазоном от 238 нм и возможностью изменять длину волны с шагом 1 (4) нм.

Реактивы. Стандартный раствор белка 60 (70) г/л. Трихлоруксусная кислота 150 г/л. Натрия хлорид 0,9% раствор (физиологический раствор).

Реактив 1: натрия карбонат 2%-й раствор в 0,1 н. растворе натрия гидроксида. *Реактив 2:* 0,5%-й раствор сульфата меди в 1%-м растворе натрия цитрата. *Рабочий раствор:* в день определения ОП и ВНСММ в биоматериале 1 мл реактива 2 смешивают с 50 мл реактива 1. *Контрольный раствор:* к 1 мл 0,9% раствора хлорида натрия прибавляют 0,5 мл ТХУ.

Реактив Фолина-Чокальтеу: 10 г натрия вольфрамата двухводного ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, перекристаллизованный) и 2,5 г натрия молибденового кислого двухводного ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) помещают в круглодонную колбу на 200-250 мл, приливают 70 мл дистиллированной воды и хорошо перемешивают. К полученному раствору добавляют 5 мл 85%-го раствора фосфорной кислоты и 10 мл концентрированной соляной кислоты марки «хч». Колбу присоединяют к обратному холодильнику на шлифе, ставят на сетку и кипятят в течение 10 ч. Затем в раствор добавляют 15 г лития сульфата, 5 мл воды и одну каплю жидкого брома. Раствор перемешивают и нагревают для удаления брома. После охлаждения доводят водой до 100 мл, фильтруют и разводят вдвое дистиллированной водой с таким расчетом, чтобы получился 1 н. раствор кислоты. Кислотность определяют титрованием разведенного в 10 раз реактива раствором 0,1 н. натрия гидроксида в присутствии фенолфталеина. Реактив хранится в темной склянке длительное время.

Ход определения

Приготовление супернатантов плазмы и эритроцитной массы

Перед взятием крови необходимо добавить гепарин (5000 ЕД/мл) в пробирки из расчета 0,01 мл на 1 мл крови.

Получение супернатанта плазмы: к 1 мл плазмы крови прибавить 0,5 мл ТХУ (используя другие объемы, соблюдают пропорцию плазма:ТХУ = 2:1), перемешать или хорошо встряхнуть и оставить при комнатной температуре на 5 мин. Затем центрифугировать при 3000 об/мин в течение 30 мин.

Получение супернатанта эритроцитной массы: эритроцитарную массу отмывают тройным объемом физраствора. Для этого к эритроцитам прибавляют равный объем физраствора, взмучивают смесь и центрифугируют при 3000 об/мин в течение 5-10 мин, надосадочный раствор сливают (отбирают пипеткой), операцию повторяют 3 раза. Далее отмытые эритроциты доводят физраствором до исходного объема крови, отмеченного при заборе материала. Затем к 1 мл отмытых и доведенных до объема крови эритроцитов приливают 0,5 мл ТХУ (эритроциты: ТХУ=2:1), перемешивают стеклянной палочкой или хорошо встряхивают и оставляют при комнатной температуре на 5 мин. Затем суспензию центрифугируют при 3000 об/мин в течение 30 мин.

Определение ОП

Подготовка стандартного раствора на ОП: разбавляют стандартный раствор белка в 1000 раз, получая концентрацию белка 0,06 (0,07) г/л.

В четырех пробирках: 1 – к 0,5 мл супернатанта плазмы; 2 – к 0,5 мл супернатанта эритроцитной массы; 3 – к 0,5 мл контрольного раствора; 4 – к 0,5 мл стандартного раствора добавляют по 0,5 мл дистиллированной воды, приливают по 2,0 мл рабочего раствора, перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 10 мин. Затем добавляют по 0,2 мл реактива Фолина-Чокальтеу. Содержимое пробирок перемешивают и через 30 мин колориметрируют при 750 нм относительно контрольного раствора.

Расчет количества ОП производят по формуле:

$$C_{ОП} = \frac{E_{ОП}}{E_{СТ}} * C_{СТ},$$

где $C_{ОП}$, $C_{СТ}$ – концентрация олигопептидов в плазме или эритроцитной массе и стандартном растворе, г/л, соответственно; $E_{ОП}$, $E_{СТ}$ – оптические плотности анализируемого и стандартного растворов в единицах оптической плотности соответственно.

Определение ВНСММ

ВНСММ в плазме определяют, добавляя к 0,2 мл супернатанта плазмы 1,8 мл дистиллированной воды, замером оптической плотности полученного раствора относительно смеси 0,2 мл контрольного раствора и 1,8 мл воды на спектрофотометре в интервале длин волн 238-298 нм с шагом 1 или 4 нм.

ВНСММ в эритроцитной массе определяют, добавляя к 0,1 мл супернатанта эритроцитной массы 1,9 мл дистиллированной воды, замером оптической плотности полученного раствора относительно смеси 0,1 мл контрольного раствора и 1,9 мл дистиллированной воды на спектрофотометре в интервале длин волн 238-300 нм с шагом 1 или 4 нм.

Расчет количества ВНСММ производят по формуле:

шаг 1 нм: $\text{ВНСММ} = (E_{238} + E_{239} + E_{240} + \dots + E_{298})$;

шаг 4 нм: $\text{ВНСММ} = (E_{238} + E_{242} + E_{246} + \dots + E_{298}) * 4$ усл. ед.,

где E_{238} – экстинкция раствора в единицах оптической плотности при указанной длине волны.

Таблица 3

Интерквартильные размахи значений для маркеров эндогенной интоксикации: олигопептидов и веществ низкой и средней молекулярных масс в плазме и эритроцитах крови белых лабораторных мышей контрольных групп

Пол особей	ОП в плазме, г/л	ОП в эритроцитах, г/л	ВНСММ в плазме, е.о.п.	ВНСММ в эритроцитах, е.о.п.	Эритроциты, 10^{12} /л
Самцы	0,1÷0,6	0,1÷0,7	2,8÷6,3	9,7÷13	73÷83
Самки	0,2÷0,5	0,1÷0,4	3,7÷6,9	8,0÷14	74÷92

2.3. Количественное определение в крови продуктов перекисного окисления белков в виде альдегидо- и кетодинитрофенилгидразонов

Продукты перекисного окисления белков (ПОБ) определяют в белковом осадке после реакции с 2,4-динитрофенилгидразином (ДНФГ). При обработке плазмы смесью ТХУ и ДНФГ образующийся окрашенный осадок растворяется в растворе мочевины и регистрируется при длинах волн 270 нм (альдегидо-2,4-динитрофенилгидразоны, АФГ или $\text{ПОБ}_{270\text{нм}}$), 363 нм и 370 нм (кето-2,4-динитрофенилгидразоны, КФГ или $\text{ПОБ}_{363-370\text{нм}}$). Степень окисленной модификации белков выражают в единицах оптической плотности на 1 мг белка [37].

Оборудование и реактивы

Оборудование. Центрифуга, весы аналитические, спектрофотометр.

Реактивы. Калий-фосфатный буфер 0,015М, рН 7,6. Раствор трихлоруксусной кислоты 150 г/л. Раствор 2,4-динитрофенилгидразина на соляной кислоте 0,1%. Смесь этилацетата с этанолом (1:1). Раствор мочевины 8М. Раствор соляной кислоты 0,1М.

Ход определения

К 0,05 мл пробы прибавляют 0,95 мл фосфатного буфера. Затем в течение 15 минут инкубируют пробу в термостате при 37°C. Далее в пробирку прибавляют 1 мл 15% раствора ТХУ и 1 мл 0,1% раствора ДНФГ. Оставляют пробу при комнатной температуре в течение 1 часа. Центрифугируют 5 минут при 3000 об/мин. Надосадок сливают, а осадок промывают 3 мл смеси этилацетат/этанол (1:1), вновь центрифугируют 5 минут при 3000 об/мин, операцию повторяют. Осадок сушат в термостате при 37°C 15 минут, а затем растворяют в 3 мл 8М раствора мочевины. Подкисляют раствор 0,02 мл 0,1М соляной кислотой.

Пробу спектрофотометрируют относительно контроля (3 мл 8М мочевины с 0,02 мл раствора соляной кислоты) в кварцевой кювете 1 см при трех длинах волн: 270 нм, 363 нм, 370 нм.

Концентрацию продуктов перекисного окисления рассчитывают в единицах оптической плотности на 1 мг белка по формулам:

$$C_{АФГ} = \frac{E_{270}}{C_{ОБ}} * V \quad \text{и} \quad C_{КФГ} = \frac{E_{363+370}}{C_{ОБ}} * V,$$

где $C_{АФГ}$ – концентрация фракции ПОБ - АФГ, ед. опт. пл./мг; E_{270} – экстинкция раствора при 270 нм в единицах оптической плотности; $C_{КФГ}$ – концентрация фракции ПОБ - КФГ, ед. опт. пл./мг; $E_{363+370}$ – сумма экстинкций раствора при 363 и 370 нм в единицах оптической плотности; V – объем взятого для анализа раствора плазмы, мл (0,05 мл); $C_{ОБ}$ – концентрация общего белка в плазме крови, г/л.

Таблица 4

Интерквартильные размахи значений для продуктов перекисного окисления белков в виде альдегидо- и кетопроизводных динитрофенилгидразина в плазме крови белых лабораторных мышей контрольных групп

Пол особей	АФГ (ПОБ _{270нм}), е.о.п./г	КФГ (ПОБ _{363-370нм}), е.о.п./г
Самцы	146÷234	12÷24
Самки	193÷260	16÷27

2.4. Количественное определение содержания гликогена в печени и мышечной ткани

Основным аккумулятором энергии у животных является гликоген [25, 38]. Для количественного определения гликогена наиболее часто используют метод с антроновым реактивом. Гексозы, дегидратируясь в присутствии концентрированной серной кислоты, конденсируются с антроном, давая соединение, окрашивающее раствор в синий цвет.

Для выделения гликогена исследуемую пробу гидролизуют щелочью на кипящей водяной бане. При высоком содержании гликогена в пробе определение проводят «прямым» методом, т.е. непосредственно из гидролизата. «Прямой» метод применяется при определении гликогена в ткани печени. Содержание гликогена в мышцах мало, поэтому перед определением его осаждают спиртом – «непрямой» метод [206, 255].

Оборудование и реактивы

Оборудование. Спектрофотометр, весы аналитические, термостат, центрифуга, баня водяная, холодильник, плитка электрическая.

Реактивы. Калия гидроксид 30% раствор в дистиллированной воде. Натрия сульфат 10% раствор в дистиллированной воде. *Антроновый реактив* - 0,2% раствор антрона в концентрированной серной кислоте. Спирт этиловый. *Стандартный раствор* гликогена - 0,1 мг/мл раствор в дистиллированной воде.

Ход определения

Определение гликогена в скелетных мышцах

Точно взвешенную навеску ткани (около 200-300 мг) помещают в пробирку. Заливают 2 мл 30% раствора калия гидроксида, встряхивают и погружают в кипящую водяную баню на 35-45 мин, через каждые 5 мин пробирку встряхивают. Далее пробирку охлаждают и к ее содержимому прибавляют 0,2 мл 10% раствора натрия сульфата и 3 мл этанола, перемешивают содержимое и оставляют на ночь (20 часов) в холодильной камере. После пробирку центрифугируют 30 мин при 3000 об/мин. Надосадочную жидкость сливают, а пробирку в перевернутом виде оставляют на 1-2 мин. Осадок растворяют в 1 мл воды и добавляют 2 мл этанола. Пробирку помещают в холодильник на 5-6 часов (можно на ночь) для лучшего осаждения гликогена. Центрифугируют при 3000 об/мин 30 мин. Надосадочную жидкость сливают и в перевернутом виде пробирку оставляют на 1-2 мин, слегка подсушивают (15 мин) при 37°C. Осадок растворяют в 2,5 мл воды (следят за тем, чтобы осадок полностью растворился), переносят в большую пробирку и добавляют 5 мл антронового реактива. Парал-

лельно этому готовят контрольный (вместо раствора 2,5 мл воды) и стандартный растворы гликогена. Пробы помещают в кипящую водяную баню на 20 мин (можно и 5-10 мин). Охлаждают и помещают в темное место на 30 мин. Затем пробы фотометрируют при 620 нм относительно контроля.

Содержание гликогена в скелетных мышцах рассчитывают по формуле:

$$C \text{ (мг/г ткани)} = (E_{\text{оп}}/E_{\text{ст}}) * M_{\text{ст}} * (2/V_{\text{пробы}}) * (1000/m_{\text{нав}}),$$

где $E_{\text{оп}}$ – экстинция опытной пробы, $E_{\text{ст}}$ – экстинция стандартной пробы, $M_{\text{ст}}$ – содержание гликогена в 2 мл стандартного раствора, мг; $V_{\text{пробы}}$ – объем аликвоты фильтрата, взятый для определения, мл; 1000 – пересчет массы навески (мг) в г; $m_{\text{нав}}$ – масса навески ткани, мг.

Определение гликогена в печени

Точно взвешенную навеску ткани (около 200 мг) помещают в пробирку. Заливают 3 мл 30% раствора калия гидроксида, встряхивают и погружают в кипящую водяную баню на 15-20 мин, через каждые 5 мин пробирку встряхивают. Далее пробирку охлаждают, ее содержимое переносят в мерную пробирку и доводят объем до 25 мл, тщательно перемешивая. Далее содержимое пробирок отфильтровывают и из фильтрата отбирают 2,5 мл раствора для определения гликогена. Для этого приливают 5 мл антронового реактива. Параллельно этому готовят контрольный (вместо раствора 2,5 мл воды) и стандартный растворы (2,5 мл стандарта глюкозы на бензойной кислоте). Пробы помещают в кипящую водяную баню на 5-10 мин. Охлаждают и фотометрируют при 620 нм относительно контроля.

Содержание гликогена в печени рассчитывают по формуле:

$$C \text{ (мг/г ткани)} = (E_{\text{оп}}/E_{\text{ст}}) * M_{\text{ст}} * 10 * (2/V_{\text{пробы}}) * (1000/m_{\text{нав}}),$$

где $E_{\text{оп}}$ – экстинция опытной пробы, $E_{\text{ст}}$ – экстинция стандартной пробы, $M_{\text{ст}}$ – содержание гликогена в 2,5 мл стандартного раствора, мг; 10 – коэффициент разведения; $V_{\text{пробы}}$ – объем аликвоты фильтрата, взятый для определения, мл; 1000 – пересчет массы навески (мг) в г; $m_{\text{нав}}$ – масса навески ткани, мг.

Таблица 5

Интерквартильные размахи значений для гликогена в печени и мышцах белых лабораторных мышей контрольных групп

Пол особей	Гликоген печени, мг/г ткани	Гликоген мышц, мг/г ткани
Самцы	34÷71	0,3÷1,8
Самки	28÷71	0,3÷1,4

2.5. Количественное определение креатина и креатинфосфата в мышечной ткани

Креатинфосфат, характеризующийся высокой лабильностью в кислой среде, можно определить по содержанию фосфора в безбелковом экстракте, из которого предварительно удален неорганический фосфат. Методы определения содержания фосфора основаны на измерении интенсивности окраски комплекса малахитового зеленого с фосфорномолибденовой кислотой или молибденовой сини, образующейся при восстановлении фосфорномолибденовой кислоты в кислой среде (например, в методе Фиске-Суббарроу восстановителем является эйконоген) [19].

Определение свободного креатина проводят в безбелковом растворе, используя реакцию с диацетилом в присутствии α -нафтола [206, 255].

Оборудование и реактивы

Оборудование. Весы аналитические, спектрофотометр, холодильник.

Реактивы. Раствор хлорной кислоты 0,5н. Раствор калия гидроксида 2н. Фенолфталеин - 0,5%-й спиртовой раствор. Раствор малахитового зеленого 0,2% в дистиллированной воде. *Раствор аммония молибдата* 4,2% в 5н растворе соляной кислоты. *Раствор α -нафтола 1% щелочной:* 6 г натрия гидроксида, 16 г натрия карбоната и 1 г α -нафтола растворяют в 100 мл дистиллированной воды. *Раствор диацетила 0,05%:* 1,6 г диметилглиоксима с 200 мл 5 н. раствора серной кислоты нагревают в колбе Вюрца с обратным холодильником, отгоняют первые 50 мл дистиллята, доводят водой до 100 мл, хранят в холодильнике. *Стандартный раствор креатина:* 6,6-7,0 мг креатина в 100 мл дистиллированной воды. *Магнезиальная смесь:* 20 г гексагидрата хлорида магния ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$), 40 г аммония хлорида, 20 мл концентрированного раствора аммиака растворяют в 200 мл дистиллированной воды. *Малахитовый реактив:* 3 объема раствора малахитового зеленого, 1 объем 4,2% раствора аммония молибдата.

Ход определения

Охлажденную (до $-70^{\circ}C$) навеску изолированной мышцы (примерно 200-300 мг) измельчают в фарфоровой ступке до однородной массы. Приливают в ступку охлажденный раствор хлорной кислоты, перемешивают, тщательно переносят в мерную пробирку, доводят раствором хлорной кислоты до 10 мл. Тщательно перемешивают и отфильтровывают. Отбирают из фильтрата 7 мл и нейтрализуют 1,8 мл 2 н. раствора КОН. Раствор охлаждают в холодильнике (около 30 мин) до выпадения осадка. Выпавший осадок калия перхлората удаляют фильтрованием и в фильтрате определяют креатин и креатинфосфат.

Определение креатина

1 мл фильтрата вносят в мерную пробирку, добавляют 1 мл щелочного раствора α -нафтола и 0,5 мл 0,05% диацетила. Объем доводят водой до 5 мл. Одновременно ставят стандартный раствор, где вместо 1 мл фильтрата вносят 1 мл стандартного раствора. Пробы перемешивают и оставляют в темном месте на 30 мин. Затем окраску колориметрируют при 540 нм при $l=0,5$ см.

Определение креатинфосфата

К 1 мл фильтрата вносят 1,5 мл магниезальной смеси (осаждение неорганического фосфата). Готовят также контрольный раствор: 1 мл раствора хлорной кислоты + 0,25 мл раствора калия гидроксида + 1,5 мл магниезальной смеси. Предварительно в фильтрате определяют рН. Для этого к небольшому объему отдельно отмеренного фильтрата добавляют каплю фенолфталеина, при этом должна развиваться слабо малиновая окраска. Для полного удаления осадка неорганического фосфата пробы оставляют в холодильнике на 30-60 мин. Затем пробы отфильтровывают. В фильтрате определяют фосфат.

Вносят: в опытные пробы – 0,1 мл фильтрата; в стандарт – к 0,05 мл стандарта из набора ($C=5$ мг/100мл) прибавляют 0,05 мл среды фильтрата - контрольный раствор (конечное разведение стандарта 0,0025 мг в 0,1 мл); контроль - 0,1 мл контрольного раствора. Во все пробы прибавляют 2 мл воды и 2 мл малахитового реактива. Оставляют для развития окраски на 15 мин. Колориметрируют против контроля при 630 нм при $l=1$ см.

Расчет производят по формуле:

$$C \text{ (мкг/г ткани)} = (E_{\text{оп}}/E_{\text{ст}}) * M_{\text{ст}} * (1000/m_{\text{нав}}),$$

где $M_{\text{ст}}$ – содержание креатина в 1,0 мл стандартного раствора, мкг (80 мкг) – для креатина; $M_{\text{ст}}$ – содержание фосфора в 0,1 мл стандартного раствора, мкг (2,5 мкг) – для креатинфосфата; 1000 – пересчет массы навески (мг) в г; $m_{\text{нав}}$ – масса навески ткани, мг.

Таблица 6

Интерквартильные размахи значений для креатина и креатинфосфата в сыворотке крови белых лабораторных мышей контрольных групп

Пол особей	Креатин, мкг/г ткани	Креатинфосфат, мкг/г ткани
Самцы	23÷25	6,5÷12
Самки	20÷23	5÷12

2.6. Количественное определение содержания лактата и пирувата в крови

Определение пирувиноградной кислоты (пирувата)

Количественное определение пирувиноградной кислоты (ПВК) по модифицированному методу Умбрайт основано на конденсации пирувата с 2,4-динитрофенилгидразином с образованием гидразона, который со щелочью дает окрашенное соединение (фотометрируют при $\lambda=440$ нм).

Определение пирувиноградной кислоты также можно проводить энзиматическим методом. Пирувиноградная кислота восстанавливается до молочной кислоты под действием лактатдегидрогеназы (ЛДГ), активность ЛДГ прямо пропорциональна скорости уменьшения концентрации никотинамиддинуклеотида восстановленного (НАДН), что регистрируется по уменьшению оптической плотности при $\lambda=366$ нм [10, 243].

Оборудование и реактивы

Оборудование. Центрифуга, спектрофотометр, весы аналитические.

Реактивы. Раствор трихлоруксусной кислоты 10%. Раствор ДНФГ 0,1% - 50 мг ДНФГ растворяют в 10 мл концентрированного раствора соляной кислоты при нагревании и доводят до 50 мл дистиллированной водой. Раствор гидроксида натрия 12%. *Стандартный раствор* 0,34 ммоль/л ПВК - 3 мг пирувиноградной кислоты растворить в 100 мл дистиллированной воды.

Ход определения

К 0,2 мл сыворотки крови добавляют 1 мл раствора ТХУ, перемешивают стеклянной палочкой, центрифугируют при 1500 об/мин 15 минут. Надосадочную жидкость полностью сливают в пробирку и добавляют 0,4 мл раствора ДНФГ. Перемешивают и оставляют в темном месте на 20 минут. Затем добавляют 1 мл раствора NaOH, и через 5 минут определяют на спектрофотометре при длине волны 505 нм, $l=5$ мм, против контроля с водой. Параллельно с опытной пробой ставят стандартную пробу, где вместо сыворотки используется 0,2 мл стандартного раствора ПВК.

Расчет концентрации опытной пробы ($C_{оп}$) проводится по формуле:

$$C_{оп} = (E_{оп}/E_{ст}) * C_{ст},$$

где $E_{оп}$ - экстинция опытной пробы, $E_{ст}$ - экстинция стандартной пробы, $C_{ст}$ - концентрация стандарта (0,34 ммоль/л).

Определение молочной кислоты (лактата)

Метод определения лактата основан на его окислении под действием лактатоксидазы в аэробных условиях до пировиноградной кислоты и пероксида водорода. Пероксид водорода под действием пероксидазы окисляет 4-аминоантипирин и *p*-хлорфенол с образованием окрашенного хинонимина. При определении молочной кислоты по реакции с параоксидифенилом из молочной кислоты в присутствии серной и фосфорной кислот и солей меди образуется уксусный альдегид, который, реагируя с параоксидифенилом, дает продукт фиолетового цвета. Интенсивность окрашивания оценивают спектрофотометрически при длине волны 565 нм.

Определение лактата также можно проводить энзиматическим методом. Молочная кислота окисляется до пировиноградной кислоты под действием ЛДГ в присутствии НАД, активность ЛДГ прямо пропорциональна скорости увеличения концентрации НАДН [243].

Оборудование и реактивы

Оборудование. Спектрофотометр.

Реактивы. Набор реагентов Лактат-ВИТАЛ: буферный раствор, pH=7,5 (50 ммоль/л трис, 6 ммоль/л *p*-хлорфенола); лиофилизат (0,4 ммоль/л 4-аминоантипирина, 200 U/л лактатоксидазы, 2000 U/л пероксидазы); калибратор (3,3 ммоль/л молочной кислоты). *Рабочий реагент:* растворяют лиофилизат в 10 мл буферного раствора. Для получения оптимальных результатов рекомендуется выдержать рабочий реагент после полного растворения лиофилизата при комнатной температуре 10 минут. Рабочий реагент стабилен не менее 2 недель при температуре 2 - 8°C.

Ход определения

К 0,01 мл сыворотки крови добавляют 1 мл рабочего реагента. Параллельно готовят калибровочную пробу, смешивая 0,01 мл калибратора и 1 мл рабочего реагента.

Содержимое пробирок перемешивают и инкубируют не менее 5 минут при 20-25°C. Пробы фотометрируют против контрольной пробы (1 мл рабочего реагента) при длине волны 505 нм в кювете $l=1$ см. Окраска стабильна не менее 20 минут после окончания инкубации.

Расчет концентрации опытной пробы ($C_{оп}$) проводится по формуле:

$$C_{оп} = (E_{оп}/E_{ст}) * C_{ст},$$

где $E_{оп}$ - экстинция опытной пробы, $E_{ст}$ - экстинция стандартной пробы, $C_{ст}$ - концентрация стандарта, ммоль/л.

Интерквартильные размахи значений для пирувата и лактата в сыворотке крови белых лабораторных мышей контрольных групп

Пол особей	Пируват, ммоль/л	Лактат, ммоль/л
Самцы	0,3÷0,7	7,2÷8,2
Самки	0,3÷1,0	5,4÷6,6

2.7. Определение ферментативной активности креатинкиназы и лактатдегидрогеназы в крови

Определение активности креатинкиназы

В основе спектрофотометрического метода определения активности креатинкиназы (КК) лежит идея использования сопряженных ферментов - гексокиназы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (ГФДГ):

креатинфосфат + АДФ \leftrightarrow креатин + АТФ (фермент КК),

АТФ + глюкоза \rightarrow АДФ + глюкозо-6-фосфат (фермент гексокиназа),

глюкозо-6-фосфат + НАДФ \rightarrow 6-Ф-глюконат + НАДФН + Н⁺ (фермент ГФДГ).

Полученная на 1-м этапе АТФ фосфорилирует глюкозу. Образующийся на 2-м этапе глюкозо-6-фосфат восстанавливает НАДФ до НАДФН.

О скорости креатинкиназной реакции в ходе эксперимента судят по изменению оптической плотности инкубационной среды в области 340 нм, обусловленному накоплением восстановленной формы пиридинового нуклеотида — продукта третьего звена цепочки сопряженных реакции [243].

Оборудование и реактивы

Оборудование. Спектрофотометр.

Реактивы. Набор реагентов СК-НАС-ВИТАЛ: буфер, рН=6,7 (100 ммоль/л имидазола, 20 ммоль/л глюкозы, 10 ммоль/л ацетата магния); лиофилизат (конечные концентрации в растворе: 30 ммоль/л фосфокреатина, 20 ммоль/л N-ацетилцистеина, 2 ммоль/л этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА), 2 ммоль/л АДФ, 2 ммоль/л НАДФ, 5 ммоль/л АМФ, 10 мкмоль/л диаденозинпентафосфата, 1500 U/л глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, 2500 U/л гексокиназы). *Рабочий реагент:* растворите лиофилизат в 10 мл буферного раствора. Для получения оптимальных результатов рекомендуется выдержать рабочий реагент после полного растворения лиофилизата при комнатной температуре 10-20 мин. Реагент стабилен не менее 7 дней при температуре 2-4°C. Перед проведением анализа нагрейте рабочий реагент до комнатной температуры.

Ход определения

Смешивают рабочий реагент и сыворотку крови в соотношении 25:1, через две минуты считывают изменения экстинкции с интервалом в 1 минуту в

течение 3 минут. Фотометрирование проводят при длине волны 340 нм против воздуха. Вычисляют среднее изменение экстинкции за 1 минуту ($\Delta E / \text{мин}$): Активность ($U/л$) = $4127 * \Delta E / \text{мин}$, $1 U/л = 16,67 \text{ нмоль}/(с*л)$.

Определение активности лактатдегидрогеназы

Активность лактатдегидрогеназы оценивают по оптимизированному оптическому тесту, основанному на спектрофотометрическом определении количества израсходованного в ходе ферментативной реакции кофермента НАДН, учитываемого по изменению поглощения при 340 нм, соответствующего характерному пику поглощения восстановленного кофермента. Также используют унифицированный метод по Севеллу и Товареку, основанный на окислении L-лактата в пируват в щелочной среде в присутствии ЛДГ сыворотки и НАД. Об активности фермента судят по содержанию пирувата, которое определяется по цветной реакции с 2,4-динитрофенилгидразином [243].

Оборудование и реактивы

Оборудование. Спектрофотометр.

Реактивы. Набор реагентов LDG FS (DGKC) Кат. № 14201 99 10. *Реагент 1:* (50 ммоль/л фосфатного буфера (pH=7,5), 0,60 ммоль/л пирувата). *Реагент 2:* (Good's буфер (pH=9,6), 0,18 ммоль/л НАДН). *Рабочий реагент:* смешать 4 части реагента 1 с одной частью реагента 2. Реагент стабилен 5 дней при температуре 2-4°C.

Ход определения

Смешивают рабочий реагент и сыворотку крови в соотношении 50:1, через минуту считывают изменения экстинкции с интервалом в 1 минуту в течение 3 минут. Фотометрирование проводят при длине волны 340 нм против воздуха. Вычисляют среднее изменение экстинкции за 1 минуту ($\Delta E / \text{мин}$):

$$\text{Активность (U/л)} = 8095 * \Delta E / \text{мин.}$$

Пересчет в систему СИ проводят по формуле: $1U/л = 16,67 \text{ нмоль}/(с*л)$.

Таблица 8

Интерквартильные размахи значений для активности креатинкиназы и лактатдегидрогеназы в сыворотке крови белых лабораторных мышей контрольных групп

Пол особей	Креатинкиназа, мккат/л	Лактатдегидрогеназа, мккат/л
Самцы	9÷21	42÷62
Самки	15÷25	44÷62

2.8. Количественное определение малонового диальдегида, активности каталазы и эритроцитарной супероксиддисмутазы в крови

Определение малонового диальдегида

Метод основан на реакции малонового диальдегида с тиобарбитуровой кислотой, которая при высокой температуре и низком значении рН протекает с образованием окрашенного триметинового комплекса, содержащего одну молекулу МДА и две молекулы тиобарбитуровой кислоты [240].

Оборудование и реактивы

Оборудование. Центрифуга медицинская, весы аналитические, спектрофотометр, баня водяная, холодильник.

Реактивы. Растворы тиобарбитуровой кислоты (0,8%-й) и ТХУ (17%-й).

Ход определения

К 0,2 мл исследуемого образца добавляют 2 мл раствора ТХУ. Для полного осаждения белков помещают исследуемую пробу в холодильник на 10-15 мин. Затем в пробирку вносят 1 мл раствора тиобарбитуровой кислоты, тщательно перемешивают и выдерживают на кипящей водяной бане 20 минут. Далее охлаждают пробу и центрифугируют при 1500 об/мин 5 минут. Определение оптической плотности проводят при длине волны 532 нм, $l=1$ см.

Расчет концентрации проводится по формуле:

$$C \text{ (моль/мл)} = (E \times 3,2) / \epsilon \times 0,2,$$

где E - экстинкция пробы; ϵ - коэффициент молярной экстинкции малонового диальдегида при 532 нм ($1,56 \times 10^5 \text{ см}^{-1} \times \text{M}^{-1}$); 3,2 мл - конечный объем пробы; 0,2 мл - объем исследуемого образца.

Определение активности супероксиддисмутазы в эритроцитах

Метод основан на способности супероксиддисмутазы конкурировать с нитросиним тетразолием (НСТ) за супероксидные анионы, образующиеся в результате аэробного взаимодействия НАДН и феназинметсульфата. За единицу активности СОД принимают количество фермента, необходимого для 50% ингибирования реакции восстановления НСТ. Активность СОД в эритроцитах выражали в мкмоль НСТ на 10^9 эритроцитов в минуту [28].

Оборудование и реактивы

Оборудование. Иономер, весы аналитические, центрифуга (3000 об/мин), спектрофотометр, морозильная камера на -20°C .

Реактивы. Буфер трис-НСl 0,2М, рН=7,6, этанол-хлороформная смесь (2,5/1,5), буфер фосфатный 0,5М, рН=8,3, раствор НАДН 1,96 мкМ, раствор нитросинего тетразолия 1,1 мкМ, раствор феназинметсульфата 0,32 мкМ.

Ход определения

Получение супернатанта. В центрифужную пробирку к 0,9 мл трис-НСl добавляют 0,1 мл взвеси эритроцитов. Для полного гемолиза пробирку оставляют при комнатной температуре на 10-15 мин. Белки осаждают путем добавления 1 мл этанол-хлороформной смеси. Пробирки с осажденным гемолизатом помещают в морозильную камеру на 10-15 минут при $t = -20^{\circ}\text{C}$. Содержимое пробирок перемешивают стеклянной палочкой и центрифугируют 10-15 минут при 3000 об/мин. В центрифужные пробирки вносят: а) фосфатный буфер - 2,2 мл; б) супернатант - 0,5 мл (холостая проба - 0,5мл воды); в) НАДН - 0,1 мл; г) НСТ - 0,1 мл. Далее пробирки помещают в водяной термостат $t=35^{\circ}\text{C}$ и прогревают. Затем добавляется феназинметсульфат (0,1 мл) и запускается реакция. Колориметрию проводят на спектрофотометре при длине волны 540 нм в кювете $l=1\text{см}$.

Расчет активности СОД проводят последовательно по формулам:

$$T\% = (E_K - E_O / E_K) \times 100,$$

где $T\%$ - процент торможения; E_K - экстинкция холостой пробы; E_O - экстинкция опытной пробы; 100 - пересчет на проценты;

$$A = ((T\% \times 10 \times 20 \times 2 \times 6 / (100 - T\%)) \times n \times 10 \times) \times k$$

или $A = (T\% \times 240 / (100 - T\%)) \times n \times k,$

где A - активность СОД в мкМ НСТ $\times 1 \cdot 10^9$ эр/мин; 10 - пересчет 0,1 мл взвеси эритроцитов на 1 мл; 20 - разведение во время получения супернатанта; 2 - пересчет супернатанта на 1 мл; 6 - разведение супернатанта в пробе; 10 - время опыта в минутах; n - число эритроцитов 1×10^9 /мл эритроцитарной взвеси; k - поправка при переводе 1 мг НСТ на мкМ НСТ=1,22.

Определение ферментативной активности каталазы

Каталаза является одним из важнейших высокоспецифичных ферментов антиоксидантной системы живых организмов. Этот фермент катализирует реакцию разложения перекиси водорода. Данный метод определения ферментативной активности каталазы основан на определении скорости разложения перекиси водорода, которая способна образовывать с солями молибдена окрашенный в желтый цвет стойкий комплекс [127].

Оборудование и реактивы

Оборудование. Весы аналитические, спектрофотометр.

Реактивы. Раствор перекиси водорода 0,03%, раствор аммония молибдата 4%.

Ход определения

В опытной пробе реакция запускается добавлением 0,1 мл сыворотки крови или гомогената ткани к 2 мл 0,03% раствора перекиси водорода. В холостую пробу вместо сыворотки вносят 0,1 мл дистиллированной воды. Реакцию в обеих пробирках останавливают через 10 мин добавлением 1 мл 4% раствора аммония молибдата. Интенсивность развившейся окраски измеряют на спектрофотометре при длине волны 410 нм при $l=10$ мм против контрольной пробы, в которую вместо перекиси водорода вносят 2 мл воды.

Активность каталазы рассчитывают по формуле:

$$E(\text{мкат/л}) = (A_{\text{хол}} - A_{\text{оп}}) \times V \times t \times K,$$

где $A_{\text{хол}}$ и $A_{\text{оп}}$ - экстинкция холостой и опытной проб; V - объем вносимой пробы 0,1 мл; t - время инкубации 600 с; K - коэффициент экстинкции перекиси водорода, равный $22,2 \times 10^3 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$.

Таблица 9

Интерквартильные размахи значений для содержания малонового диальдегида, активности эритроцитарной супероксиддисмутазы и каталазы в сыворотке крови белых лабораторных мышей контрольных групп

Пол особей	Малоновый диальдегид, мкмоль/л	Супероксиддисмутаза, мкМ НСТ* эр/мин	Каталаза, мккат/л
Самцы	6÷13	29÷121	2,3÷3,0
Самки	6÷9	65÷118	3,3÷7,3

2.9. Определение количества общих липидов, общего холестерина и триглицеридов в крови

Определение общего холестерина

Метод определения общего холестерина основан на ряде последовательных ферментативных реакций. Эфиры холестерина под действием холестеролэстеразы гидролизуются до холестерина и жирных кислот. Образовавшийся холестерин под действием холестеролоксидазы окисляется кислородом воздуха с образованием эквивалентного количества перекиси водорода. Далее перекись водорода под действием пероксидазы окисляет хромогенные субстраты с образованием эквивалентного количества окрашенного продукта. Интенсивность окрашивания оценивают спектрофотометрически при длине волны 500 нм [216].

Оборудование и реактивы

Оборудование. Спектрофотометр.

Реактивы. Набор реагентов Холестерин-ВИТАЛ. *Реагент № 1:* фосфатный буфер рН= 7,3, фенол 20 ммоль/л. *Реагент № 2:* лиофилизат (холестеролэстераза, холестеролоксидаза, пероксидаза, хромогены). *Реагент №3:* калибратор холестерин 5,17 ммоль/л (200 мг/100мл). Перед определением готовят рабочий реагент – растворяют реагент № 2 в реагенте № 1.

Ход определения

К 0,02 мл плазмы крови добавляют 2 мл рабочего реагента. Параллельно готовят калибровочную пробу (к 0,02 мл калибратора добавляют 2 мл рабочего реагента) и холостую пробу (к 0,02 мл дистиллированной воды добавляют 2 мл рабочего реагента). Содержимое пробирок перемешивают и инкубируют не менее 5 минут при температуре 20–25°C. Затем измеряют оптическую плотность калибровочной и опытной проб относительно холостой при длине волны 500 нм в кюветах $l = 0,5(1)$ см. Окраска стабильна не менее 2 часов после окончания инкубации при предохранении от солнечного света.

Расчет концентрации холестерина (С) проводится по формуле:

$$C = (E_{\text{оп}}/E_{\text{ст}}) * C_{\text{ст}},$$

где $E_{\text{оп}}$ - экстинция опытной пробы, $E_{\text{ст}}$ - экстинция стандартной пробы, $C_{\text{ст}}$ - концентрация стандарта, ммоль/л или мг/100мл.

Определение триглицеридов

Метод определения триглицеридов основан на ряде последовательных ферментативных реакций. Триглицериды гидролизуются под действием липазы до глицерина и жирных кислот. Затем образовавшийся и находящийся в пробе глицерин в присутствии АТФ фосфорилируется под действием глицерокиназы с образованием глицерил-3-фосфата и АДФ. Далее глицерил-3-фосфат под действием глицерофосфатоксидазы окисляется кислородом воздуха до диоксиацетонфосфата и перекиси водорода, которая в свою очередь под действием пероксидазы окисляет хромогенные субстраты с образованием окрашенного продукта. Интенсивность окрашивания оценивают спектрофотометрически при длине волны 505 нм [216].

Оборудование и реактивы

Оборудование. Спектрофотометр.

Реактивы. Набор реагентов Триглицериды-ВИТАЛ. *Реагент № 1:* буфер (Трис буфер рН= 7,5 – 50 ммоль/л, 4-хлорфенол - 4 ммоль/л, $MgCl_2$ - 1 ммоль/л). *Реагент № 2:* лиофилизат (АТФ, липаза, глицерокиназа, глицеролфосфатокси-

даза, пероксидаза, 4-аминоантипирин). *Реагент № 3*: калибратор, эквивалентный концентрации триглицеридов 2,85 ммоль/л (250 мг/100мл).

Перед определением готовят рабочий реагент – растворяют реагент № 2 в реагенте № 1.

Ход определения

К 0,02 мл плазмы крови добавляют 2 мл рабочего реагента. Параллельно готовят калибровочную пробу (к 0,02 мл калибратора добавляют 2 мл рабочего реагента) и холостую пробу (к 0,02 мл дистиллированной воды добавляют 2 мл рабочего реагента). Содержимое пробирок перемешивают и инкубируют не менее 5 минут при температуре 20–25°C. Затем измеряют оптическую плотность калибровочной и опытной проб относительно холостой при длине волны 500 нм в кюветах $l = 0,5$ (1) см. Окраска стабильна не менее 1 часа после окончания инкубации при предохранении от солнечного света.

Расчет концентрации триглицеридов в опытной пробе (С) проводится по формулам:

$$C(\text{мг}/100\text{мл}) = (E_{\text{оп}}/E_{\text{ст}}) * 250 - 10$$

или

$$C(\text{ммоль}/\text{л}) = (E_{\text{оп}}/E_{\text{ст}}) * 2,85 - 0,11,$$

где $E_{\text{оп}}$ - экстинция опытной пробы, $E_{\text{ст}}$ - экстинция стандартной пробы, $C_{\text{ст}}$ - концентрация стандарта, 0,11 ммоль/л или 10 мг/100мл – поправка на содержание свободного глицерина в плазме (сыворотке) крови.

Определение общих липидов

Метод основан на реакции гидролизата общих липидов (гидролиз серной кислотой при температуре 90-100°C) плазмы крови с ванилином в среде фосфорной кислоты с образованием окрашенного продукта с максимумом поглощения при длине волны 540 нм.

Оборудование и реактивы

Оборудование. Спектрофотометр, баня водяная.

Реактивы. Кислота серная концентрированная, ч.д.а. Набор реагентов Общие липиды – PLIVA-Lachema Diagnostika. *Реактив № 1*: стандартный раствор общих липидов (8 г/л). *Реактив № 2*: раствор ванилина (ванилин – 10 ммоль/л, кислота ортофосфорная – 11,5 моль/л).

Ход определения

Получение гидролизата: в трех пробирках смешивают 1,5 мл серной кислоты с 0,02 мл плазмы (опытная проба), с 0,02 мл реактива № 1 (стандарт) и с 0,02 мл дистиллированной воды (контрольный раствор), перемешивают и нагревают в течение 15 минут на кипящей водяной бане. Затем охлаждают пробирки

проточной водой. Далее в новых пробирках смешивают 0,01 мл полученного гидролизата с 1,5 мл реактива № 2 и инкубируют при 15-25°C в течение 50 минут. Затем измеряют оптическую плотность опытной пробы и стандарта относительно контрольного раствора при длине волны 540 нм в кюветах l=1 см.

Расчет концентрации общих липидов в пробе (С) проводится по формуле:

$$C(\text{г/л}) = (E_{\text{оп}}/E_{\text{ст}}) * C_{\text{ст}},$$

где $E_{\text{оп}}$ - экстинция опытной пробы, $E_{\text{ст}}$ - экстинция стандартной пробы, $C_{\text{ст}}$ - концентрация стандарта.

Таблица 10

Интерквартильные размахи значений для содержания общих липидов, общего холестерина и триглицеридов в плазме крови белых лабораторных мышей контрольных групп

Пол особей	Общие липиды, г/л	Холестерин, ммоль/л	Триглицериды, ммоль/л
Самцы	1,7÷2,6	1,8÷2,8	0,3÷0,5
Самки	1,6÷3,0	1,9÷2,5	0,5÷0,9

Глава 3. МЕТИЛФОСФОНОВАЯ КИСЛОТА И ЕЕ ВЛИЯНИЕ НА МЕТОБОЛИЗМ МЕЛКИХ ГРЫЗУНОВ

3.1. Метилфосфоновая кислота и особенности метаболизма белков мелких грызунов

Влияние МФК на белковый метаболизм мелких грызунов в зависимости от времени воздействия в краткосрочном эксперименте изучали в течение 5 суток. Результаты проведенных исследований по некоторым показателям белкового обмена лабораторных мышей через 12, 24, 48, 72, 96 и 120 часов после введения МФК в дозе 2 мг/кг показали, что наиболее значительные отклонения относительно контрольных групп с характерными половыми отличиями наблюдались через 12 и 72 часа.

Нами было обнаружено, что введение МФК вызывает изменения в содержании общего белка крови лабораторных мышей, а также в распределении белковых фракций. На рис. 1 показан пример электрофореграммы белка плазмы: видны отдельные фракции глобулинов (смещение в сторону отрицательного электрода), а также широкая полоса альбумина (смещение в сторону положительного электрода) [279, 245].

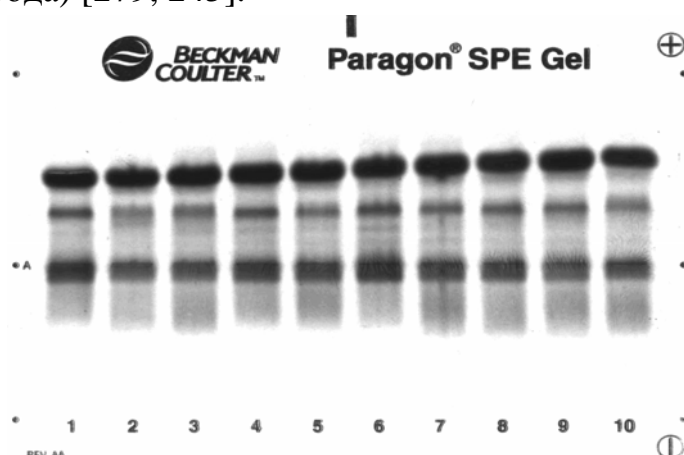


Рис. 1. Электрофореграмма плазмы 10 самцов белых лабораторных мышей опытных групп через 72 часа после введения МФК в дозе 2 мг/кг массы

Результаты электрофореза плазмы показали, что у самцов наиболее часто отмечалась неспецифическая гиперпродукция максимально: α 1-, α 2-глобулинов через 12 часов; α 1-, β -глобулинов через 72 часа после введения МФК в дозе 2 мг/кг массы животного (рис. 2). Подобное изменение глобулинов часто диагностируется при воспалительных процессах различного происхождения, в том числе в результате токсических гепатитов [167, 184, 243].

В отличие от самцов, у самок через 12 часов после введения МФК наблюдалась гипер- γ -глобулинемия на 22%, сопровождаемая понижением α 1- и β -

глобулинов на 39% и 15% соответственно, а через 72 часа был отмечен рост общего белка на 16% за счет гиперпродукции $\alpha 2$ -, β -глобулинов на 50% и 18% соответственно, что сопровождалось увеличением концентрации альбумина в крови на 27% (рис. 3).

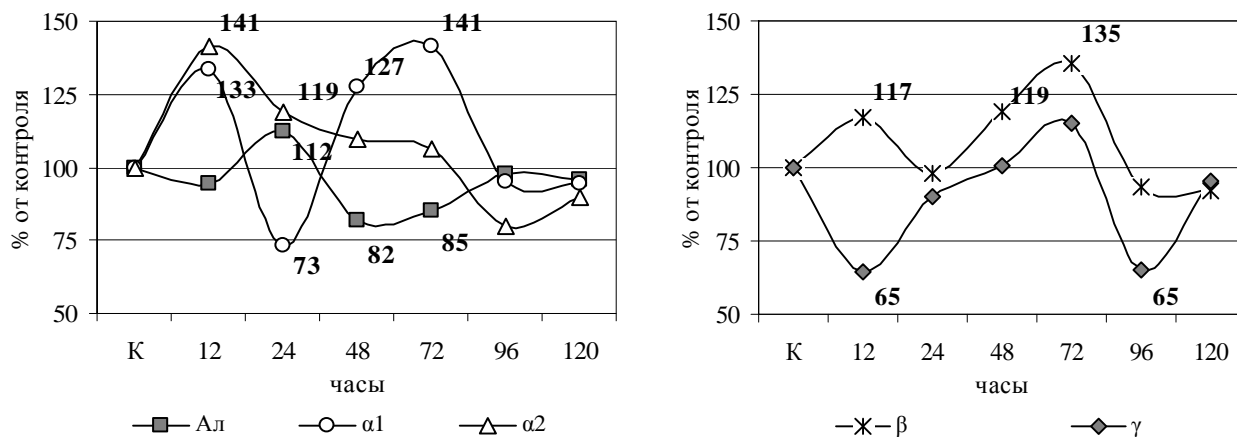


Рис. 2. Изменение содержания белковых фракций в плазме крови самцов в зависимости от времени после введения МФК в дозе 2 мг/кг: К – контрольная группа; значения отличий в процентах указаны в случае статистически значимых различий при $p < 0,05$

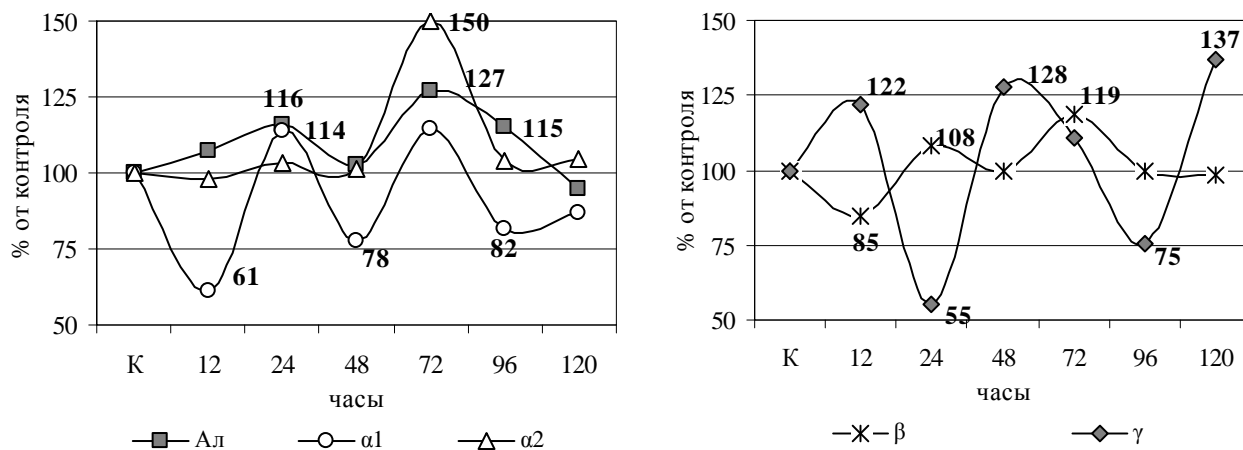


Рис. 3. Изменение содержания белковых фракций в плазме крови самок в зависимости от времени после введения МФК в дозе 2 мг/кг: обозначения - см. рис. 2

Наблюдалась нормализация содержания альбумина и глобулинов в крови самцов лабораторных мышей через 96 часов после введения МФК, за исключением сниженного содержания γ -глобулинов на 35%, возможно, из-за угнетения иммунной системы [135]. У самок через 96 часов отмечен рост содержания альбумина на 15%, сниженное содержание $\alpha 1$ -, γ -глобулинов на 18% и 25% соответственно. Через 120 часов у самцов отличий от контрольных групп не наблюдалось, у самок была отмечена гипер- γ -глобулинемия на 37%.

Введение МФК в дозе 2 мг/кг лабораторным мышам также привело к изменению содержания продуктов ПОБ и маркеров эндогенной интоксикации.

ПОБ является одним из ранних индикаторов повреждения ткани, что обосновывает изучение динамики образования продуктов окислительной модификации белков при различных патологических состояниях организма как в экспериментальных, так и клинических исследованиях [37-39, 128].

Как указывает Е.Е. Дубинина, ПОБ вызывает как минимум три типа изменений физико-химических свойств белковой молекулы: фрагментацию, агрегацию и подверженность к протеолизу [71]. Как следствие, происходит накопление карбонильных производных (АФГ и КФГ), инактивация активных центров ферментов, образование продуктов с высокой функциональной активностью и модификация белковых молекул [93].

Указанные последствия ПОБ – подверженность к протеолизу и фрагментация модифицированных молекул – приводят к избыточному образованию и накоплению олигопептидов, которые являются одним из конечных продуктов окислительной модификации белков [62, 123].

Через 12 часов после введения МФК у самцов отмечалось увеличение содержания продуктов ПОБ в виде роста АФГ на 18%, КФГ на 90%; наблюдали рост ОП в плазме на 24% и эритроцитах на 106%, ВНСММ (преимущественно катаболического происхождения) в плазме на 38% (рис. 4). У самок лабораторных мышей через 12 часов такого роста показателей отмечено не было, только концентрация ВНСММ в плазме увеличивалась на 11%. Кроме того, достоверно уменьшалось содержание АФГ на 14% и ВНСММ в эритроцитах на 19%.

Можно предположить, что в течение 12 часов после введения МФК в дозе 2 мг/кг наблюдалась острая реакция в ответ на введение чужеродного соединения (МФК) как инициатора катаболических процессов, окислительной модификации белков, вызывающих рост концентрации продуктов ПОБ и появление эндотоксинов, при этом отмечалась наибольшая выносливость самок к стрессу по сравнению с самцами.

Спустя 24 часа после введения МФК в дозе 2 мг/кг массы животного в крови самцов происходило увеличение ОП в плазме на 81% и снижение ВНСММ в эритроцитах на 32%; у самок – рост ОП в эритроцитах на 36%; подробные данные представлены на рис. 4.

Анализ крови через 48 часов после подкожной инъекции мышам опытных групп мышей растворов МФК в дозе 2 мг/кг не показал больших изменений изучаемых показателей, однако следует указать на снижение ОП в эритроцитах у самцов и самок на 33% и 18% соответственно.

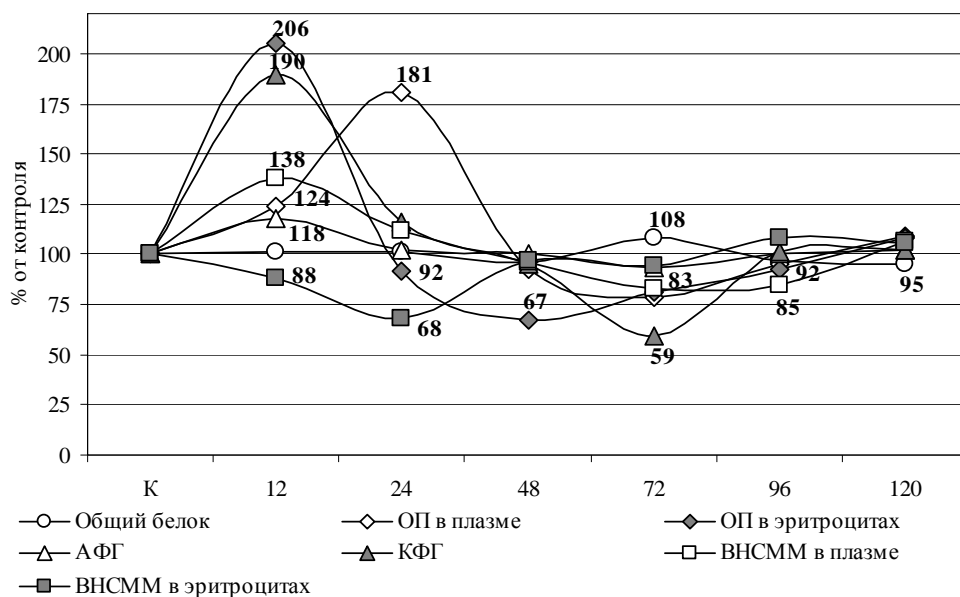


Рис. 4. Суммарная картина изменения значений показателей белкового обмена у самцов лабораторных мышей в зависимости от времени после введения МФК в дозе 2 мг/кг массы животного: обозначения - см. рис. 2

Через 72 часа после введения МФК наибольшие изменения биохимических показателей были отмечены у самок лабораторных мышей. Наблюдалось снижение АФГ и КФГ на 19% и 54% соответственно, ВНСММ и ОП в плазме на 25% и 48% соответственно; был зарегистрирован рост ВНСММ в эритроцитах на 17% (рис. 5). В крови самцов наибольшие изменения через 72 часа были отмечены для КФГ (снижение на 41%) и ВНСММ в плазме (снижение на 17%).

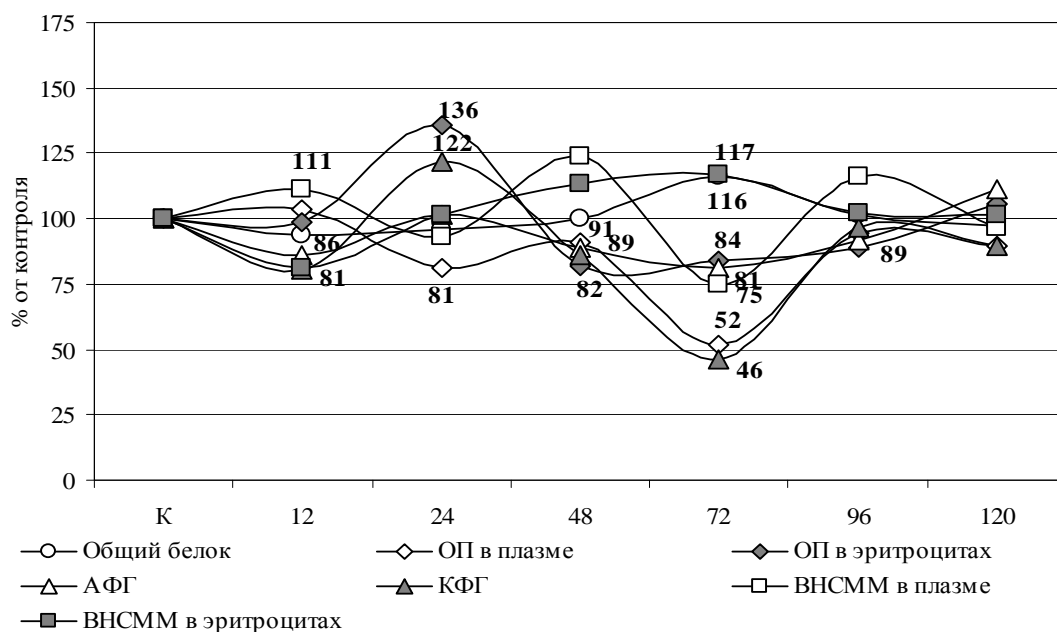


Рис. 5. Суммарная картина изменения значений показателей белкового обмена у самок лабораторных мышей в зависимости от времени после введения МФК в дозе 2 мг/кг массы животного: обозначения - см. рис. 2

Мы предположили, что влияние МФК в дозе 2 мг/кг массы животного заключалось в первоначальном взаимодействии МФК с липидным окружением клеточной мембраны (благодаря наличию бифильных свойств), приведшем к изменению конформаций окружающих белковых, липидных молекул и нарушению проницаемости каналов, обеспечивающих мембранный транспорт. Это могло привести к внутриклеточному накоплению продуктов белковой дегградации и препятствию их поступления в кровоток, о чем и говорило снижение ОП и ВНСММ. Отмеченное снижение продуктов ПОБ, по всей вероятности, связано с ингибированием процессов свободнорадикального окисления за счет передачи электрона со свободных радикалов антиоксидантам (например, витамину Е). Не исключено также действие МФК на систему внутриклеточной передачи информации через цАМФ.

Проведенный факторный анализ полученных результатов исследований показал наличие трех факторов влияния МФК на показатели крови самцов и самок лабораторных мышей, описывающих около 95% дисперсии. Обнаруженные отличия через 72 часа после введения МФК в дозе 2 мг/кг описывались факторами работы АОС, выведением эндотоксинов и сорбцией эндотоксинов эритроцитами.

Нормализация значений большинства изучаемых биохимических показателей нами наблюдалась через 96 и 120 часов после введения МФК в дозе 2 мг/кг самцам и самкам лабораторных мышей, что фиксировалось по отсутствию достоверных отличий (рис. 4, 5).

Нами был предложен коэффициент информативности K_I , который рассчитывался по формуле:

$$K_I = \frac{2 \sum \%_t}{\sum \%_{t-1} + \sum \%_{t+1}},$$

где $\sum \%_t$ – суммарный процент достоверных отличий через t ч после введения МФК (например, 72 ч), $\sum \%_{t-1}$ - через $t-1$ шаг часов (к примеру, 48 ч), $\sum \%_{t+1}$ - через $t+1$ шаг часов (к примеру, 96 ч).

Расчет коэффициента позволил заключить, что максимальное отклонение значений изучаемых показателей относительно контрольных групп наблюдалось через 72 часа после подкожного введения МФК в дозе 2 мг/кг массы животного самцам и самкам лабораторных мышей (рис. 6).

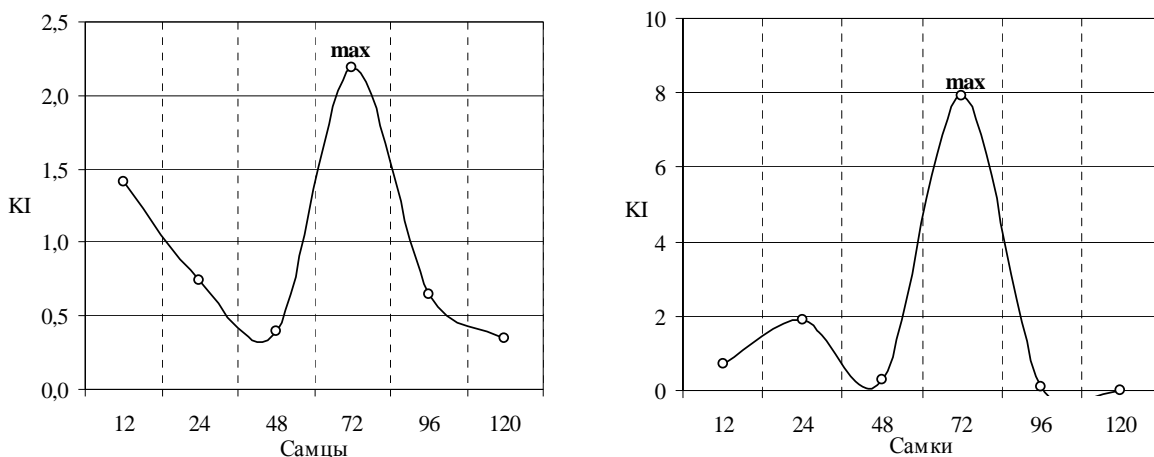


Рис. 6. Изменение коэффициента информативности (K_I) биохимических показателей в зависимости от времени после введения МФК в дозе 2 мг/кг группам самцов и самок лабораторных мышей: *max* – максимальное значение K_I

По результатам исследования биохимических показателей после введения раствора МФК мышам в дозе 2 мг/кг через 12-120 часов было определено, что наибольшее отличие между биохимическими показателями крови опытных и контрольных групп лабораторных мышей наблюдалось спустя 72 часа.

На рис. 7 показаны изменения концентрации общего белка, продуктов ПОБ, ОП и ВНСММ в крови самцов и самок лабораторных мышей через 72 часа после введения МФК в дозе 2 мг/кг.

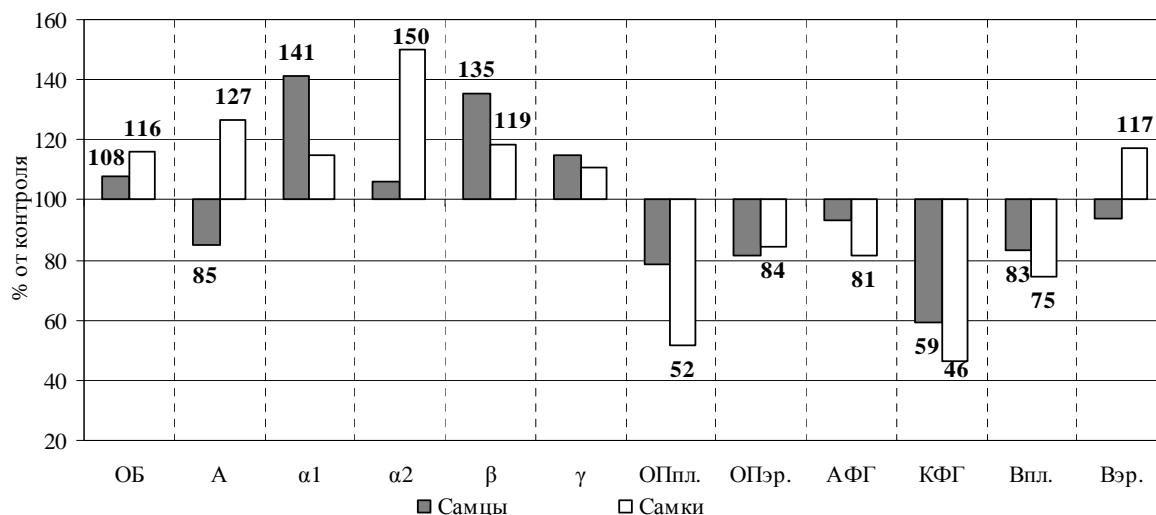


Рис. 7. Изменение изучаемых биохимических показателей крови самцов и самок опытных групп через 72 часа после введения МФК в дозе 2 мг/кг; ОБ – общий белок; А – альбумин; α1, α2, β, γ – фракции глобулинов; ОПл., ОПэр. – ОП в плазме и эритроцитах; Впл., Вэр. – ВНСММ в плазме и эритроцитах; АФГ, КФГ – фракции ПОБ; представлены значения отличий в % в случае достоверных отличий при $p < 0,05$

В итоге наблюдались одинаковые тенденции изменения биохимических показателей крови самцов и самок грызунов, при этом стоит отметить наибольшее изменение гомеостаза у самок по сравнению с самцами через 72 часа после введения МФК.

Таким образом, было определено, что МФК оказывает влияние на процессы перекисного окисления белков и содержание маркеров эндогенной интоксикации в крови белых лабораторных мышей. При подкожном введении МФК в дозе 2 мг/кг массы животного максимальное изменение изучаемых биохимических показателей наблюдается через 72 часа после введения.

Влияние МФК на белковый метаболизм мелких грызунов в краткосрочном эксперименте изучали в зависимости от различных доз в интервале от 2 мг/кг до 10^{-18} мг/кг с шагом в три порядка. При изучении влияния различных доз МФК при введении лабораторным мышам нами была отмечена разнонаправленность влияния высоких (2, 10^{-3} мг/кг массы животного) и низких (10^{-12} , 10^{-15} мг/кг массы животного) доз МФК.

Введение лабораторным мышам МФК в различных дозах приводило к небольшим изменениям общего белка в крови животных. Максимальное увеличение содержания общего белка происходило в крови самок на 16% при введении МФК в дозе 2 мг/кг и в крови самцов на 14% при введении МФК в дозе 10^{-12} мг/кг.

Изменения происходили также в качественном составе общего белка (рис. 8). Было отмечено, что при введении самцам лабораторных мышей МФК в дозе 2 мг/кг наблюдалась гиперпродукция $\alpha 1$ -, β -глобулинов на 35% и 41% соответственно. Подобным образом на содержание глобулинов оказывала влияние МФК в дозе 10^{-15} мг/кг: рост $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ -, β -глобулинов на 44%, 24%, 25% соответственно. У самок также было отмечено увеличение фракции глобулинов при введении МФК в дозах 2, 10^{-9} , 10^{-15} мг/кг, при этом рост $\alpha 2$ -глобулинов наблюдался на 50%, 112% и 34% соответственно. Стоит отметить, что МФК оказала в крови самцов наибольшее влияние на распределение глобулинов при введении в дозе 10^{-15} мг/кг, самок – при введении в дозе 2 мг/кг. По увеличению фракции глобулинов можно утверждать о наличии острофазового ответа [154] на интоксикацию МФК как в случае с дозой 2 мг/кг, так и при введении дозы 10^{-15} мг/кг массы животного.

На рис. 9 приведены данные изменения содержания продуктов ПОБ и маркеров эндогенной интоксикации в крови самцов лабораторных мышей при введении различных доз МФК. Увеличение содержания ОП в плазме и эритроцитах, свидетельствующее об усилении катаболических процессов, наблюдалось при введении МФК в дозах 10^{-3} , 10^{-6} , 10^{-9} , 10^{-15} мг/кг массы животного. Максимальное увеличение ОП в плазме на 90% было отмечено при введении МФК в дозе 10^{-15} мг/кг, а в эритроцитах возрастало на 27% при введении МФК

в дозе 10^{-3} мг/кг. Наблюдаемое повышение, вероятно, указывает на развитие синдрома эндогенной интоксикации, где накопление таких эндотоксинов, как ОП, скорее связано с интенсификацией патологической белковой деградации [124, 135, 146, 151].

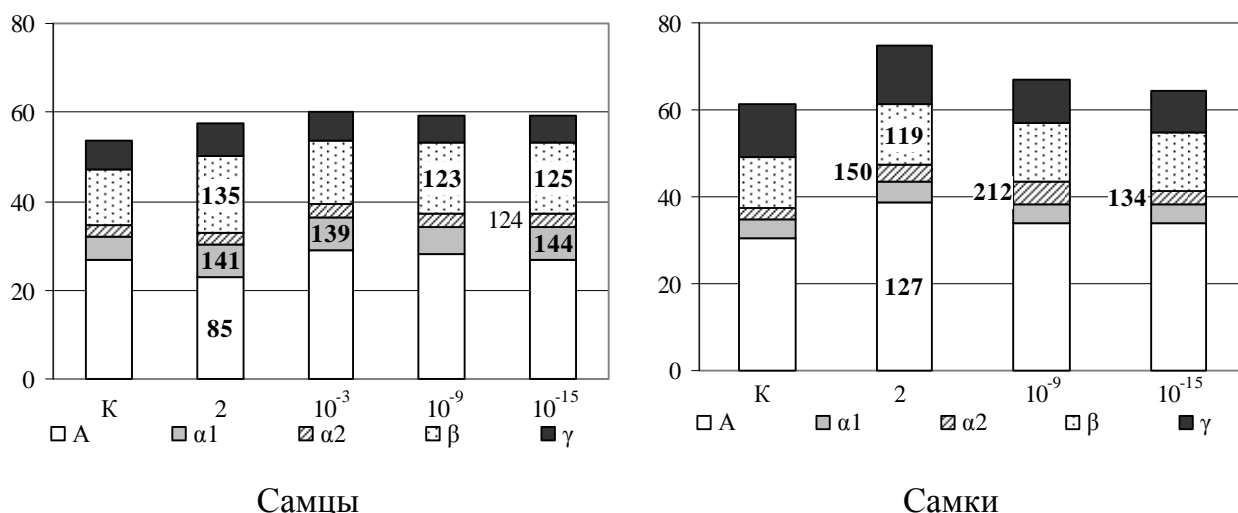


Рис. 8. Изменение содержания белковых фракций (в г/л) в плазме самцов и самок через 72 часа после введения различных доз МФК: К – контрольная группа; по оси абсцисс – значения доз МФК в мг/кг массы животного; ОБ – общий белок; А – альбумин; $\alpha 1$, $\alpha 2$, β , γ – фракции глобулинов; указаны процентные отличия от контрольных групп в случае достоверных отличий при $p < 0,05$

Снижение КФГ на 72% наблюдалось при введении МФК в дозе 10^{-3} мг/кг, а увеличение на 28% - при введении МФК в дозе 10^{-9} мг/кг. При инъекции самцам лабораторных мышей МФК в дозе 10^{-15} мг/кг происходило повышение продуктов ПОБ и АФГ и КФГ на 35%, 77% соответственно, указывающее на усиление процессов окислительной модификации белков [14, 26].

Обращают на себя внимание особенности изменения концентрации ВНСММ в плазме самцов лабораторных мышей. Достоверное снижение ВНСММ в плазме при введении доз МФК 2, 10^{-6} , 10^{-12} мг/кг на 17%, 34%, 69% соответственно изменило тенденцию на рост на 47% (за счет роста продуктов катаболического происхождения на 206%), 37% при введении МФК в дозах 10^{-15} , 10^{-18} мг/кг соответственно. При этом ВНСММ в эритроцитах увеличивались на 20% при введении МФК в дозе 10^{-15} мг/кг, уменьшались на 15% при введении МФК в дозе 10^{-18} мг/кг (рис. 9).

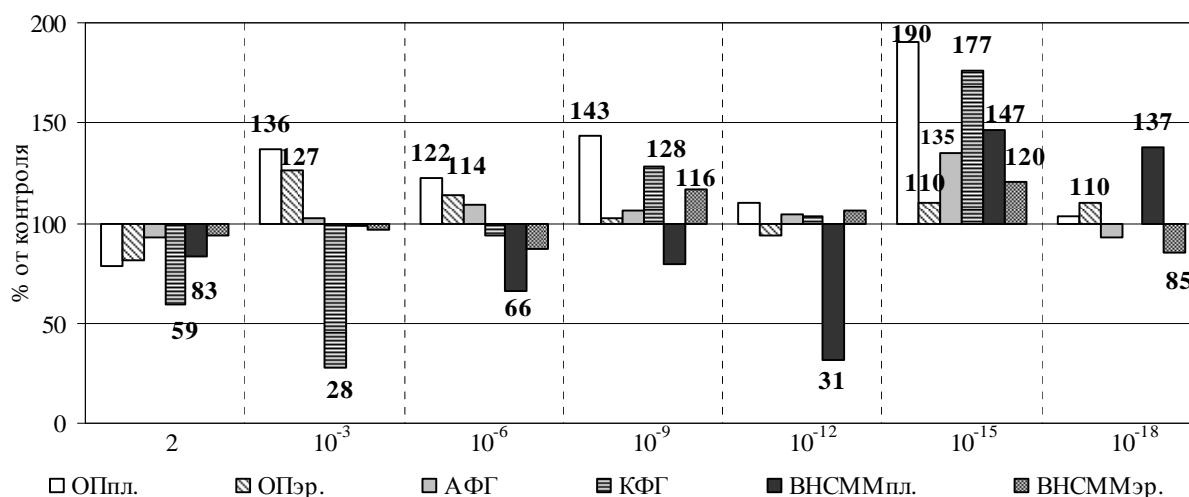


Рис. 9. Изменение значений биохимических показателей самцов лабораторных мышей через 72 часа после введения различных доз МФК: по оси абсцисс указаны дозы МФК в мг/кг массы животного; представлены значения отличий в % в случае достоверных отличий при $p < 0,05$

Подкожное введение раствора МФК в дозе 10^{-9} мг/кг приводило к росту общего белка в крови самцов за счет фракции β -глобулинов на 23%, у самок же за счет роста α_2 -глобулинов происходило увеличение на 112%. При этом было отмечено повышение продуктов ПОБ в виде КФГ у самцов и самок лабораторных мышей в среднем на 30%, в то время как у самок наблюдалось снижение АФГ на 15%. Также у мышей отмечалось достоверное повышение ОП в плазме в среднем на 40% и ВНСММ в эритроцитах на 20% в виде производных катаболического происхождения.

Полученные данные позволили установить усиление процессов белковой деградации и развитие синдрома эндогенной интоксикации на ранней стадии.

У самок мышей наибольшие отличия изучаемых показателей отмечались при введении МФК в дозе 10^{-3} мг/кг (рис. 10). У самцов происходило подобное увеличение ОП в плазме и эритроцитах на 21 и 29% соответственно. Также наблюдалось уменьшение продуктов ПОБ (АФГ на 27%, КФГ на 79%) и снижение ВНСММ в плазме на 65%.

Сложно в полной мере оценить такое действие МФК на ход свободнорадикального окисления белков. Можно только предположить антиоксидантную активность МФК (связь «углерод-фосфор» в молекуле МФК имеет наименьшую энергию диссоциации $E_{P-O} > E_{P-C}$ на 32 ккал/моль) или инициированную гиперпродукцию антиоксидантов (как, например, в опухолевых тканях) [16].

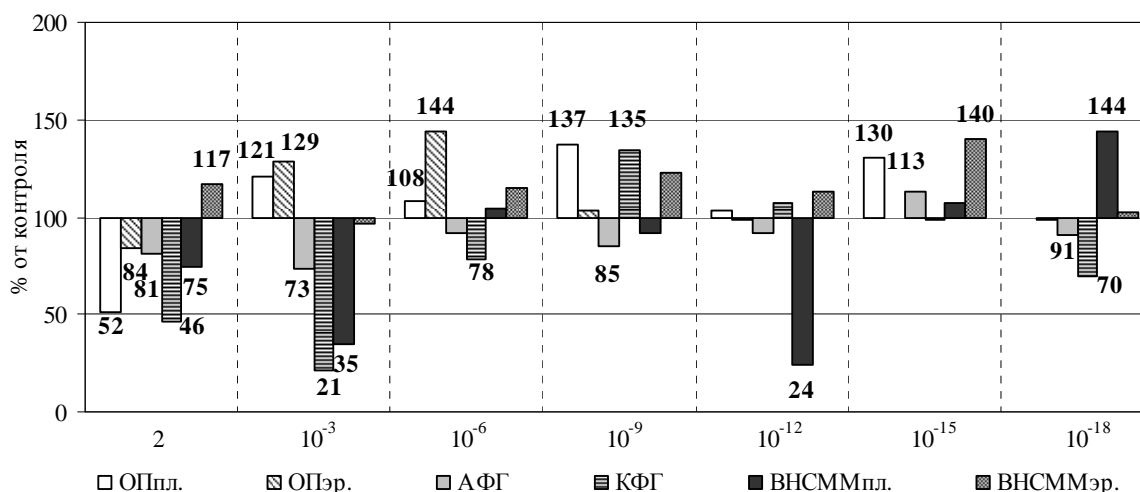


Рис. 10. Изменение значений биохимических показателей самок лабораторных мышей через 72 часа после введения различных доз МФК: обозначения - см. рис. 9

У мышей произошло увеличение фракции ОП и более глубокие изменения в содержании продуктов ПОБ. Можно предположить, что процессы окислительной модификации белков вызывали более глубокие изменения в АОС самок лабораторных мышей.

Аналогичные изменения происходили при введении МФК в дозе 2 мг/кг, но кроме роста фракции ОП, что согласуется с предположением о нарушении мембранного транспорта.

У самок подобно самцам происходило снижение ВНСММ в плазме при введении МФК в дозах 2, 10⁻³, 10⁻¹² мг/кг массы на 25%, 65%, 76% соответственно.

Было отмечено отсутствие влияния МФК в дозе 10⁻⁶ мг/кг на процессы окислительной модификации белков лабораторных мышей, но за исключением небольшого снижения КФГ на 22% у самок. Введение представленной дозы МФК самкам привело только к росту концентрации ОП в эритроцитах на 44%. Накопление ОП только в эритроцитах самок, вероятно, было свидетельством нормального функционирования гликокаликса эритроцитов как переносчиков образующихся эндотоксинов.

Введение МФК в дозе 10⁻¹⁵ мг/кг массы животного самкам лабораторных мышей приводило к одновременному росту ОП в плазме на 30%, АФГ на 13% и ВНСММ в эритроцитах на 40%.

Расчетный индекс интоксикации (ИИ), который вычислялся по формуле: ИИ=ВНСММпл.*ОПпл.+ВНСММэр.*ОПэр., показал достоверное увеличение ИИ у самцов на 128% и у самок на 35% относительно контрольных групп при введении МФК в дозе 10⁻¹⁵ мг/кг. Это указывает на наличие наиболее выраженного синдрома эндогенной интоксикации у самцов. Однако снижение содержания ВНСММ в плазме самцов и самок на 69% и 76% после введения МФК в до-

зе 10^{-12} мг/кг подкреплялось достоверным уменьшением ИИ в среднем на 35% относительно контрольных групп, что, возможно, было связано с нарушением азотного обмена в виде угнетения фоновых катаболических процессов.

МФК в дозе 10^{-18} мг/мл приводила к небольшому колебанию биохимических показателей, наблюдалась нормализация значений некоторых показателей крови, за исключением содержания ВНСММ в плазме и эритроцитах лабораторных мышей и продуктов ПОБ в крови самок.

Анализ полученных данных по воздействию различных доз МФК на организмы лабораторных мышей показал, что самцы более подвержены воздействию МФК. У них наблюдался синдром эндогенной интоксикации через 72 часа после введения МФК в дозе 10^{-15} мг/кг массы животного [200].

На рис. 11 показаны значения коэффициента информативности применительно к дозозависимому эксперименту. Расчет K_I позволил определить, что наибольшие отличия значений изучаемых показателей относительно контрольных групп наблюдались у самцов и самок лабораторных мышей при введении МФК в дозах 10^{-3} , 10^{-9} , 10^{-15} мг/мл.

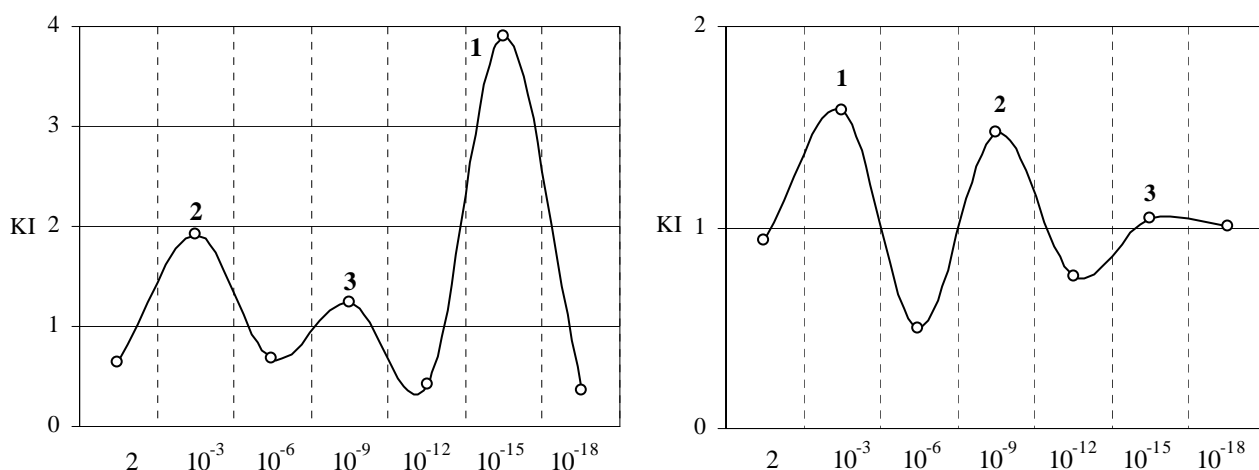


Рис. 11. Изменение коэффициента информативности (K_I) биохимических показателей в зависимости от вводимых доз МФК группам самцов и самок лабораторных мышей: 1, 2, 3 – максимумы на графиках в порядке уменьшения

Так как изменения изучаемых показателей крови были более выражены при введении МФК у самцов, мы сделали вывод о необходимости дальнейшего изучения однократного введения доз МФК 10^{-3} и 10^{-15} мг/кг самцам с целью определения необходимого времени для нормализации изучаемых показателей.

Проанализировав полученные данные, мы заключили, что МФК обладает ярко выраженным дозозависимым эффектом с наибольшим достоверным изменением содержания продуктов ПОБ и маркеров эндогенной интоксикации в крови лабораторных мышей после введения МФК в дозах 10^{-3} , 10^{-15} мг/кг массы

животного, действуя двумя основными путями. Первый путь воздействия носит регуляторный характер, приводит к усилению катаболических процессов и окислительной модификации белков, вызывая повышение содержания маркеров эндогенной интоксикации на 30-90% и продуктов ПОБ на 20-80%. Второй путь воздействия, реализуемый в высоких дозах МФК, приводит к нарушению мембранного транспорта, вызывает снижение содержания продуктов ПОБ и маркеров эндогенной интоксикации.

Влияние МФК в высоких и низких дозах на белковый метаболизм мелких грызунов в долговременном эксперименте. Введение высоких и малых доз МФК - 10^{-3} и 10^{-15} мг/кг массы животного - самцам лабораторных мышей осуществлялось однократно, а временной промежуток до эвтаназии варьировался с 6 до 30 суток, нами оценивались изменения изучаемых биохимических показателей в сравнении с краткосрочным экспериментом. Так как выбранные дозы МФК лежали в рамках высоких и низких доз, это позволило в полной мере оценить адаптивные способности самцов.

Были получены значения биохимических показателей контрольных групп самцов через 3, 6, 9 суток после введения физиологического раствора. Ввиду того, что достоверных отличий между этими группами не наблюдалось, нами производилось их объединение и усреднение в единую контрольную группу, с которой сравнивались полученные значения опытных групп после интоксикации дозами МФК.

Данные о содержании общего белка в плазме крови самцов опытных групп грызунов представлены на рис. 12. Изучая содержание общего белка в крови самцов, мы пришли к выводу об отсутствии значительных изменений ввиду того, что максимальные достоверные отличия не превышали 10% (смена положения тела, сон/бодрствование).

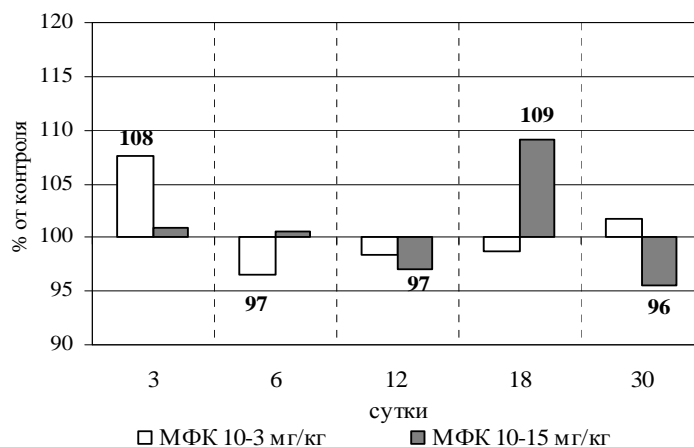


Рис. 12. Изменение содержания общего белка в плазме самцов через 3, 6, 12, 18, 30 суток после введения МФК в дозах 10^{-3} , 10^{-15} мг/кг; указаны проценты в случае достоверных отличий при $p < 0,05$

Ранее было показано, что введение самцам МФК в дозах 10^{-3} и 10^{-15} мг/кг массы животного через 72 часа вызывало достоверное увеличение содержания основных маркеров синдрома эндогенной интоксикации – ОП и ВНСММ в плазме и эритроцитах, что свидетельствовало о повышенной эндогенной нагрузке и развитии эндотоксикоза. Подобная картина может сопровождать адаптацию к введению МФК или срыв адаптивных механизмов. Следствием этого является развитие патологического состояния, определяемое в итоге одним из главных факторов регуляции метаболизма — взаимоотношением антиоксидантных и прооксидантных механизмов, иными словами, способностью АОС защитить клетку от свободных радикалов и перекисей [32, 73, 91-93, 159].

Представленные на рис. 13 данные об изменении содержания ОП в плазме и эритроцитах крови самцов позволяют сделать вывод о ликвидации процессов белковой деградации к 30 дням после введения доз МФК.

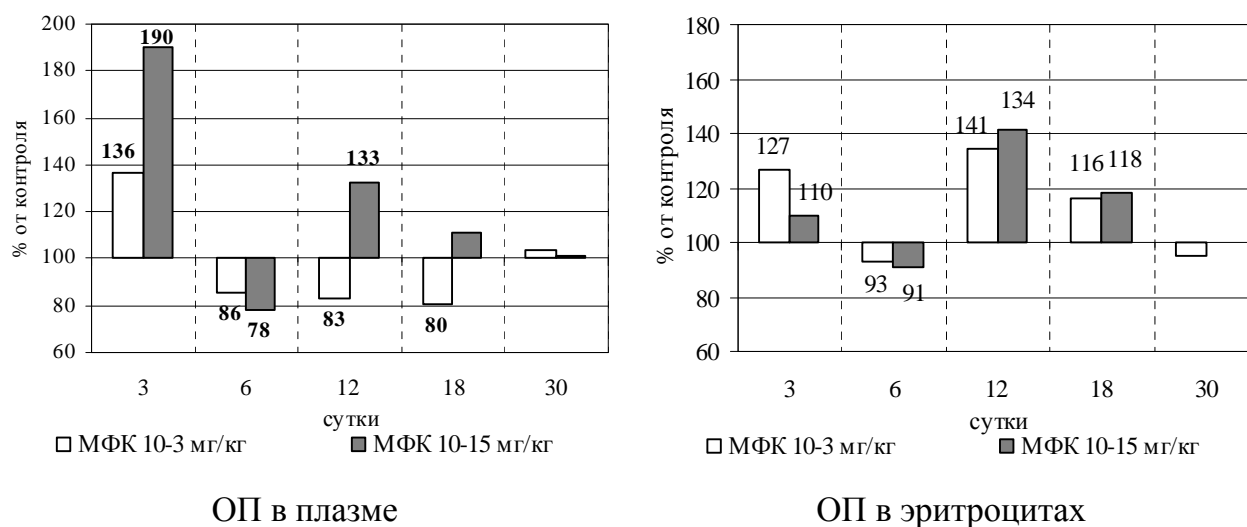
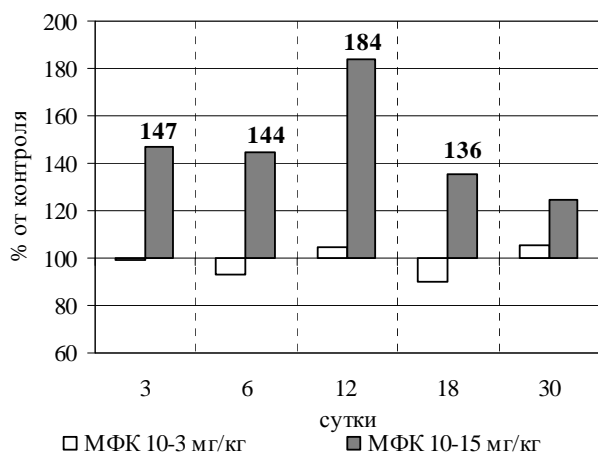


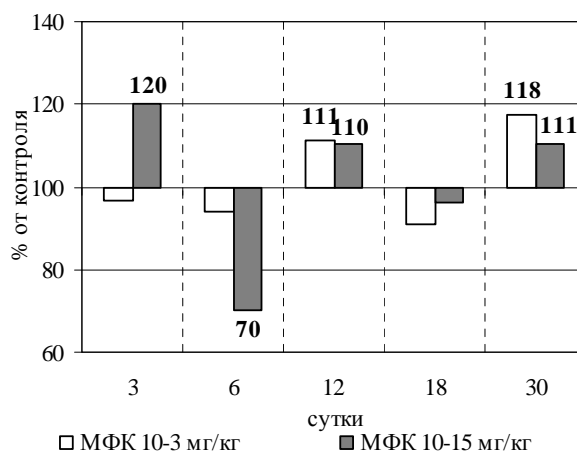
Рис. 13. Изменение содержания олигопептидов в плазме и эритроцитах крови самцов через 3, 6, 12, 18, 30 суток после введения МФК в дозах 10^{-3} , 10^{-15} мг/кг; указаны проценты достоверных отличий при $p < 0,05$

Отмеченное максимальное увеличение содержание ОП в плазме на 33% и ОП в эритроцитах на 34% через 12 суток после введения МФК в дозе 10^{-15} мг/кг массы животного свидетельствует о протекании долговременных процессов, вызванных влиянием МФК.

Данные изменения распределения фракции ВНСММ между плазмой и массой эритроцитов после введения доз МФК самцам показаны на рис. 14.



ВНСММ в плазме



ВНСММ в эритроцитах

Рис. 14. Изменение содержания ВНСММ в плазме и эритроцитах крови самцов через 3, 6, 12, 18, 30 суток после введения МФК в дозах 10^{-3} , 10^{-15} мг/кг массы животного; указаны проценты достоверных отличий при $p < 0,05$

Необходимо отметить факт достоверного отличия содержания ВНСММ в плазме лишь при введении МФК в дозе 10^{-15} мг/кг массы животного на протяжении всего срока эксперимента. Максимальное увеличение ВНСММ в плазме наблюдалось на 84% через 12 суток после введения МФК в дозе 10^{-15} мг/кг. Далее следовало снижение содержания ВНСММ в плазме, которое приводило к недостоверным отличиям.

Были отмечены колебания концентрации ВНСММ в эритроцитах при введении МФК (рис. 14). Увеличение ВНСММ в эритроцитах на 11% и 10% через 12 суток после введения МФК в дозах 10^{-3} и 10^{-15} мг/кг массы животного согласуется с фактом роста ВНСММ в плазме. Через 30 суток после инъекции МФК наблюдалось небольшое достоверное повышение концентрации ВНСММ в эритроцитах при отсутствии отличий в плазме, что, вероятно, свидетельствует о нарушении процессов десорбции эндотоксинов эритроцитами в печени.

Начиная с 12 суток после введения МФК, отмечен плавный рост концентрации фракции ПОБ – АФГ, достигающий максимума через 30 суток: увеличение на 29% и 33% после введения МФК в дозах 10^{-3} и 10^{-15} мг/кг массы животного соответственно (рис. 15). Подобным образом проходил рост содержания КФГ в плазме до 70% через 30 суток после введения МФК в дозе 10^{-15} мг/кг массы животного.

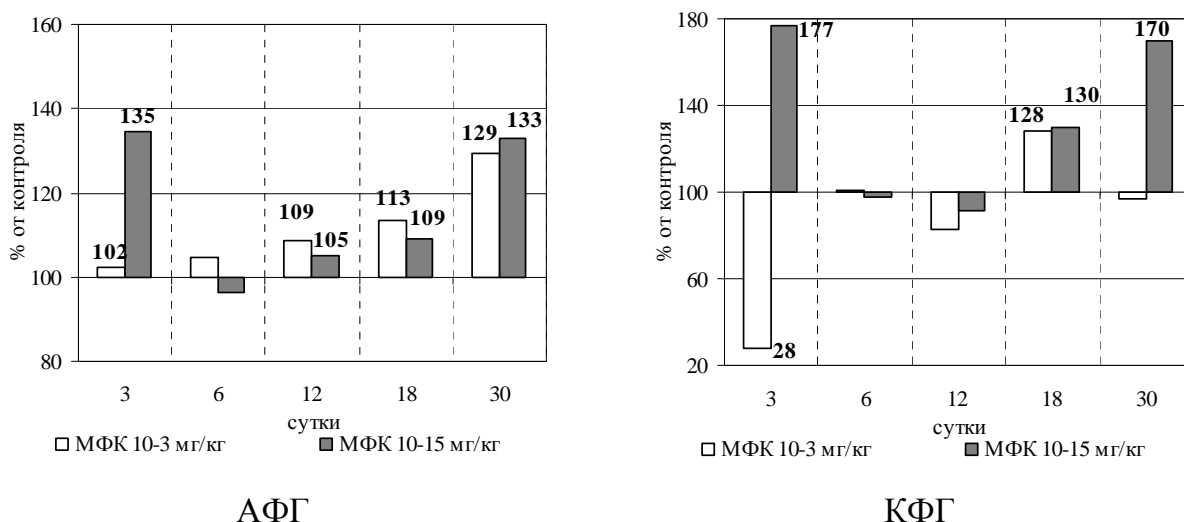


Рис. 15. Изменение содержания $ПОВ_{270нм}$ в виде АФГ и $ПОВ_{363+370нм}$ в виде КФГ в плазме самцов через 3, 6, 12, 18, 30 суток после введения МФК в дозах 10^{-3} , 10^{-15} мг/кг; указаны проценты в случае достоверных отличий при $p < 0,05$

Достоверное повышение продуктов ПОВ, рост содержания ВНСММ в эритроцитах через 30 суток после введения МФК говорят об истощении АОС, причем глубина биохимических сдвигов была более выражена при введении МФК в дозе 10^{-15} мг/кг (согласованный рост АФГ и КФГ).

Таким образом, МФК в дозах 10^{-3} , 10^{-15} мг/кг массы животного после однократного введения самцам лабораторных мышей вызывает обратимые изменения в содержании общего белка и маркеров эндогенной интоксикации в крови, о чем говорит нормализация изучаемых биохимических показателей через 30 суток после введения МФК. Исключение составляют продукты ПОВ, концентрация которых в крови остается повышенной.

Для дальнейшего изучения в качестве биомаркеров присутствия ФОС в природных средах можно рекомендовать как продукты ПОВ, так и ОП, ВНСММ в плазме в качестве наиболее информативных показателей влияния МФК в совокупности с показателями других обменных процессов.

3.2. Метилфосфоновая кислота и особенности энергетического метаболизма у мелких грызунов

Влияние МФК на показатели энергетического обмена мелких грызунов в зависимости от времени воздействия в краткосрочном эксперименте изучали в течение 5 суток.

С целью выявления особенностей углеводного обмена здоровых мышей линии СВА была сформирована референтная группа (20 самцов и 20 самок здоровых белых лабораторных мышей линии СВА). По полученным нами данным

были установлены нормальные значения показателей углеводного обмена мышцей линии СВА, содержащихся в стандартных условиях вивария.

В наибольшей степени половые различия у мышцей линии СВА проявлялись в содержании креатинфосфата в скелетных мышцах и активности лактатдегидрогеназы в сыворотке крови. Нами также были обнаружены половые различия в корреляционных зависимостях между содержанием энергетических субстратов в скелетных мышцах и печени лабораторных мышцей линии СВА. Так, для самок была обнаружена обратная зависимость между содержанием гликогена в печени и скелетных мышцах ($r = -0,77$, $p = 3,8 \cdot 10^{-5}$), а для самцов – прямая зависимость ($r = 0,61$, $p = 0,002$). Между запасами гликогена и креатинфосфата (КрФ) в скелетных мышцах у самок была выявлена прямая зависимость ($r = 0,68$, $p = 0,0005$), а у самцов – обратная ($r = -0,45$, $p = 0,02$); аналогично между уровнем креатина и КрФ в скелетных мышцах также обнаружена прямая зависимость для самок ($r = 0,72$, при $p = 0,0002$) и обратная зависимость для самцов ($r = -0,57$, $p = 0,005$).

В эксперименте по установлению срока максимального изменения биохимических показателей в ответ на однократное подкожное введение МФК в дозе 2 мг/кг массы животного проводилось определение показателей углеводного обмена лабораторных мышцей опытных и контрольных групп через 12, 24, 48, 72, 96 и 120 часов после введения МФК. В этом эксперименте использовано по 130 особей самцов и самок одного возраста и массы.

При анализе содержания гликогена в тканях лабораторных мышцей обнаружена особенность: динамика изменения содержания гликогена в печени опытных групп самцов и самок одинакова (рис. 16).

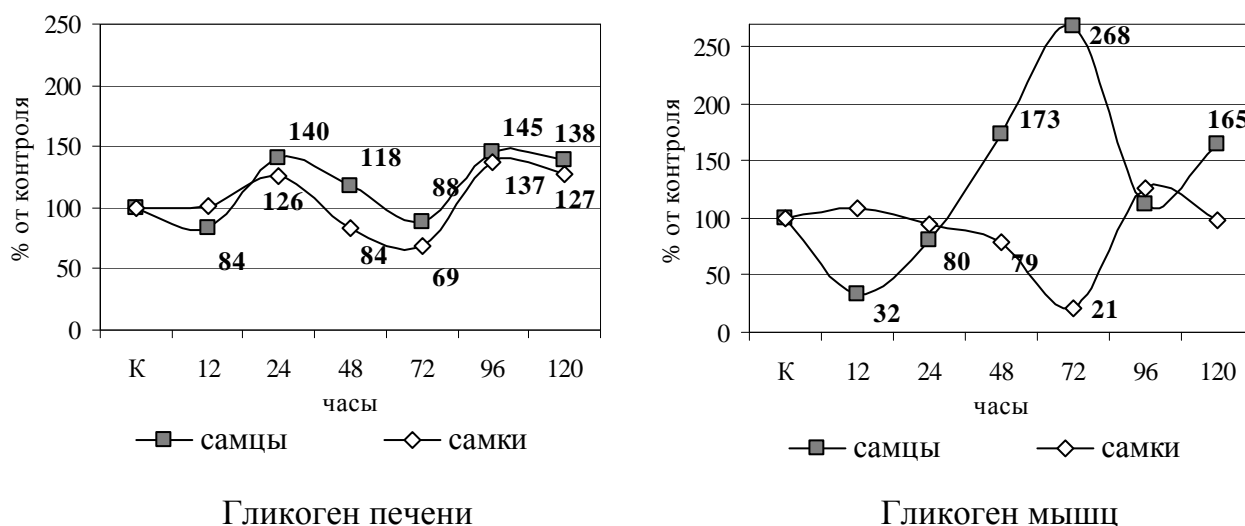


Рис. 16. Содержание гликогена печени и мышц самок и самцов опытных групп лабораторных мышцей после введения МФК в дозе 2 мг/кг: по оси абсцисс – срок эксперимента; К – контрольная группа; значения отличий указаны в случае статистически значимых различий при $p < 0,05$

Уровень гликогена печени лабораторных мышей опытных групп после введения МФК в дозе 2 мг/кг изменялся по типу синусоиды с точками минимума через 72 часа (88% у самцов и 69% у самок) и точками максимума через 24 и 96 часов (140 и 145% у самцов, 126 и 137% у самок соответственно).

В изменении относительного содержания гликогена мышц самцов после введения МФК в дозе 2 мг/кг прослеживалась определенная динамика. Сначала происходило значительное (в 8,4 раза) увеличение относительно контрольных значений в течение первых 3 суток (с 32 % через 12 часов до 268 % через 72 часа), затем наблюдалось уменьшение содержания гликогена мышц до уровня контрольных значений и повторное повышение до 165% через 120 часов.

Таким образом, изменение содержания гликогена в тканях имело определенные половые различия, связанные с различной гормональной регуляцией адаптации организма мышей в ответ на введение МФК в дозе 2 мг/кг. Так, у самцов преобладали процессы образования гликогена в тканях, а у самок – процессы распада. У самок наблюдалась схожая динамика изменения содержания гликогена в печени и мышцах, у самцов такой зависимости обнаружено не было. Введение МФК в дозе 2 мг/кг оказывало большее влияние на уровень гликогена в тканях самцов лабораторных мышей.

Креатин и креатинфосфат, как и гликоген, являются энергетическими субстратами, незаменимыми для энергетического обмена, мышечного движения и существования организма [19, 36].

Данные об изменении содержания КрФ и креатина в скелетных мышцах лабораторных мышей контрольной и опытной групп представлено на рис. 17.

Для определения направленности изменений в системе $\text{КрФ} \leftrightarrow \text{Креатин}$ нами был проведен расчет суммарного содержания, а также соотношения КрФ и креатина в скелетных мышцах лабораторных мышей.

Расчет этих коэффициентов для опытной группы самок показал, что через 12 часов после инъекции МФК соотношение КрФ/Креатин, а также их суммарное содержание достоверно снижались (на 19 и 11% соответственно) за счет снижения содержания как креатина (на 9%), так и КрФ (на 30%). Учитывая, что содержание гликогена в тканях не менялось, можно предположить, что в ответ на введение МФК в дозе 2 мг/кг через 12 часов наблюдалась повышенная потребность организма в энергии, удовлетворение которой происходило за счет активации креатинфосфокиназного механизма ресинтеза АТФ. У опытной группы самцов через 12 часов после введения МФК наблюдалось понижение содержания гликогена при неизменном уровне креатина и КрФ, что свидетельствовало в пользу активации гликолитического механизма ресинтеза АТФ.

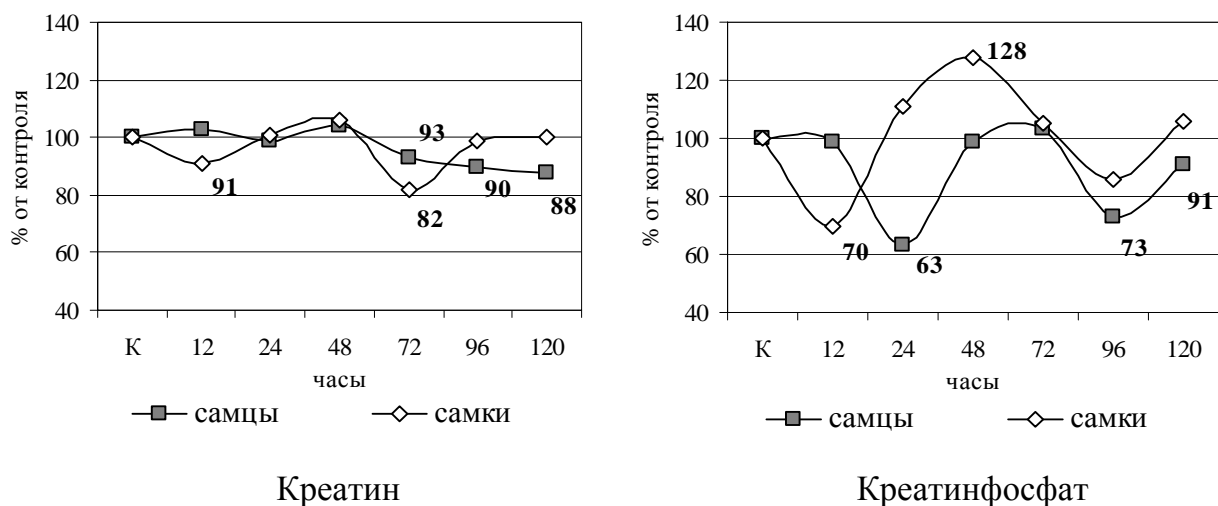


Рис. 17. Содержание креатина и креатинфосфата в мышцах самок и самцов опытных групп лабораторных мышей после введения МФК в дозе 2 мг/кг: обозначения - см. рис. 16

Через 48 часов после введения МФК в дозе 2 мг/кг наблюдалось увеличение (на 17-26%) суммарного содержания креатина и КрФ, а также соотношения КрФ/Креатин за счет повышения на 28% относительного содержания КрФ скелетных мышц самок. Через 72 часа эксперимента в скелетных мышцах самок лабораторных мышей было выявлено достоверное уменьшение суммарного содержания КрФ и креатина (на 10%) при увеличении их соотношения на 31%, что было обусловлено понижением уровня креатина на 18%. В свою очередь наблюдаемое через 72 часа и далее снижение (на 7-12%) суммарного содержания креатина и креатинфосфата в скелетных мышцах самцов опытной группы было связано со снижением (на 7-12%) относительного содержания креатина. Соотношение КрФ/Креатин для опытной группы самцов повторяло динамику изменения относительных значений содержания КрФ. Поэтому достоверное снижение относительных значений содержания КрФ через 24 и 96 часов после введения раствора МФК в дозе 2 мг/кг (на 37 и 27% соответственно) вызывало достоверное понижение соотношения КрФ/Креатин в эти же сроки эксперимента (на 27 и 15% соответственно). В целом наблюдаемые изменения свидетельствуют о возможном распаде данных метаболитов до креатинина.

Согласно полученным нами данным, активность креатинкиназы (КК) в сыворотке крови опытной группы самок и самцов (рис. 18) имела схожую динамику изменений в ответ на введение МФК в дозе 2 мг/кг: наблюдалось повышение активности относительно контроля с 24 до 96 часов (с 40 % до 133 % у самок и с 24 % до 136 % у самцов соответственно) и нормализация через 120 часов. Это, по всей видимости, свидетельствовало о восстановлении процессов переноса фосфорильных остатков. При этом у самцов отмечено значительное повышение (в 2,1 раза относительно контроля) активности КК через 12 часов

эксперимента, в то время как у самок на данное время достоверных отличий не обнаружено.

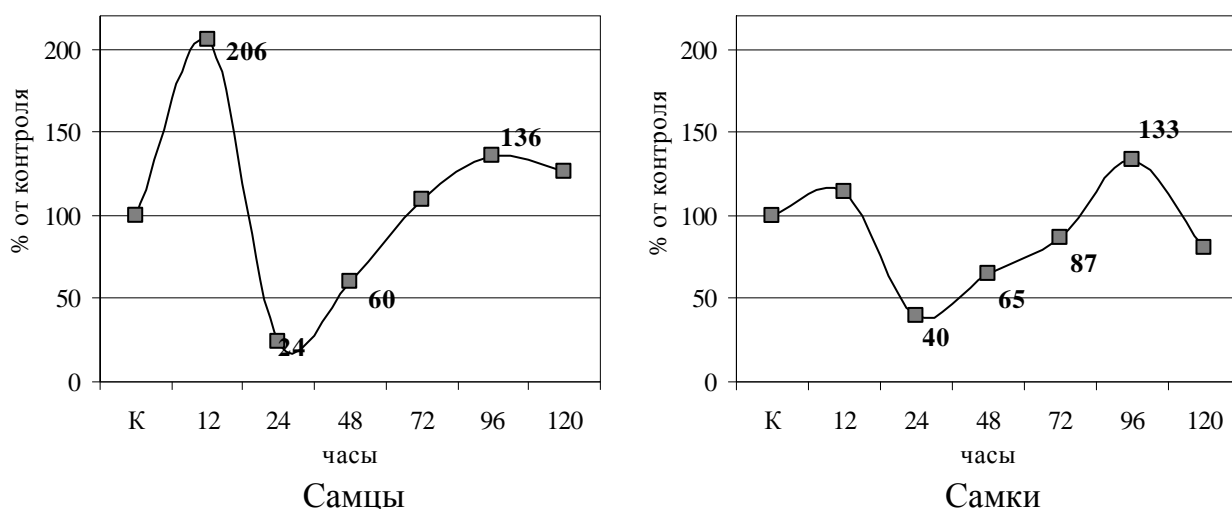


Рис. 18. Активность креатинкиназы сыворотки крови самок и самцов опытных групп лабораторных мышей после введения МФК в дозе 2 мг/кг: обозначения - см. рис. 16

В ответ на введение МФК в дозе 2 мг/кг содержание пирувата сыворотки крови у самцов лабораторных мышей повышалось на всех сроках эксперимента (максимально на 38% через 24 часа после введения), кроме 12 часов (отмечено понижение на 22%) (рис. 19).

У самок наблюдалось значительное (в 1,9 раза относительно контроля) увеличение содержания пирувата сыворотки крови через 72 часа эксперимента, а понижение (на 18-20 %) наступало через 24 и 48 часов после введения МФК в дозе 2 мг/кг. В целом это говорит об активности процессов гликолиза.

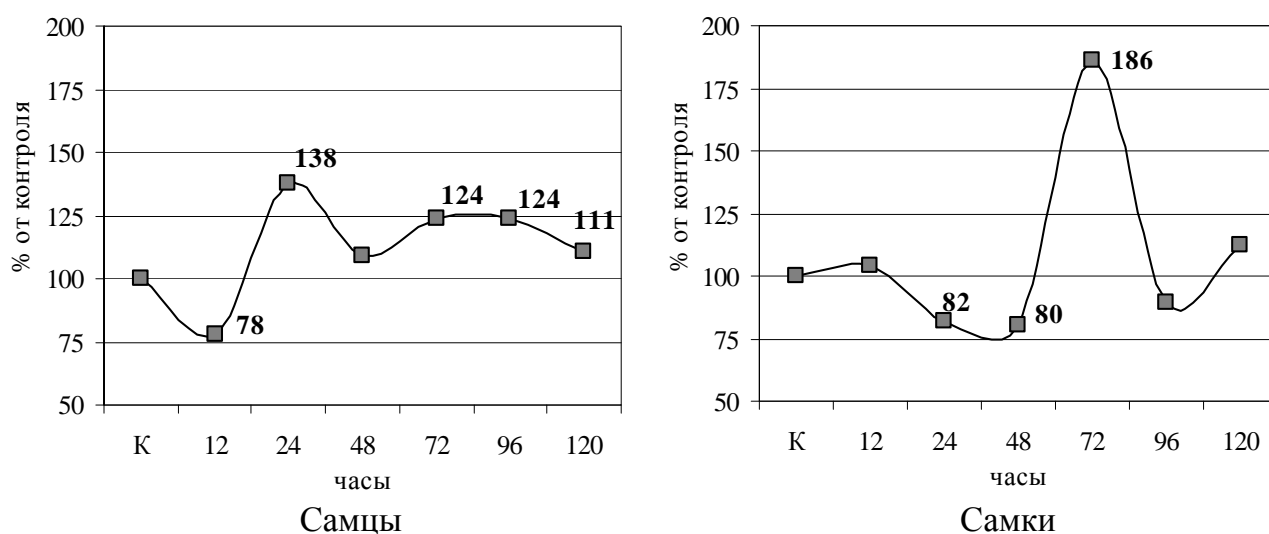


Рис. 19. Содержание пирувата в сыворотке крови самок и самцов опытных групп лабораторных мышей после введения МФК в дозе 2 мг/кг: обозначения - см. рис. 16

Активность ЛДГ, катализирующей обратимую реакцию превращения лактата в пируват, после введения МФК в дозе 2 мг/кг значительно не менялась: у самок понижение наблюдалось через 48 часов на 27 %, а повышение наступало через 72 часа на 8 % относительно контроля; у самцов – повышение через 72 и 120 часов эксперимента на 18 и 17% соответственно.

Таким образом, при установлении срока максимального изменения показателей углеводного обмена лабораторных мышей после подкожного введения МФК в дозе 2 мг/кг было выяснено, что наибольшее изменение большинства показателей наблюдается через 72 часа эксперимента.

Анализ полученных данных выявил, что через 72 часа после введения МФК в дозе 2 мг/кг у самок лабораторных мышей наблюдалась активация катаболических процессов углеводно-энергетического обмена (рис. 20).

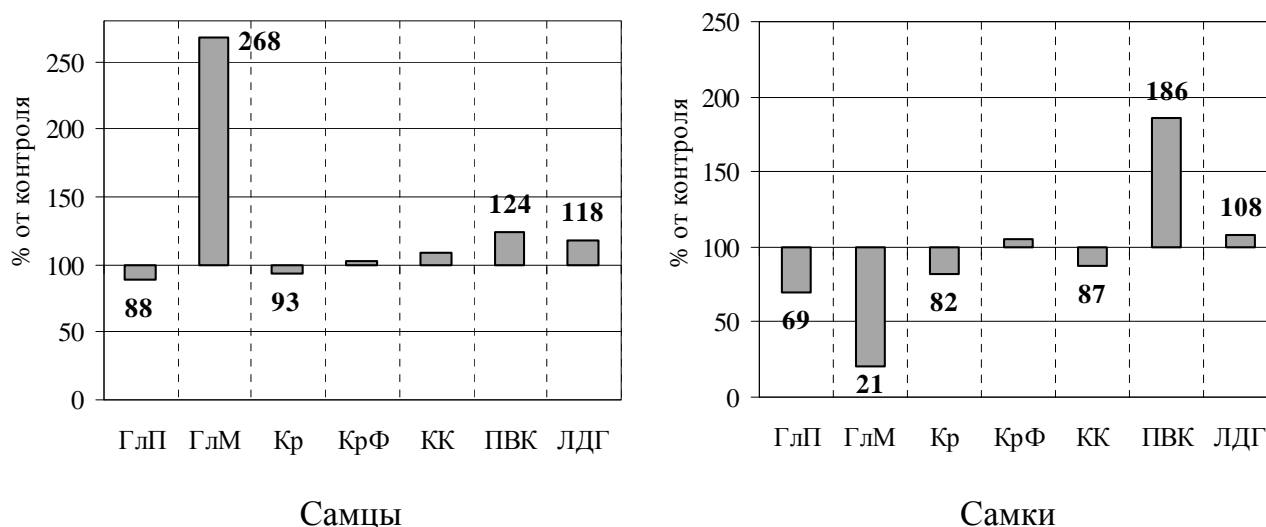


Рис. 20. Биохимические показатели углеводного обмена самок и самцов опытных групп лабораторных мышей через 72 часа после введения МФК в дозе 2 мг/кг: ГлП – гликоген печени, ГлМ – гликоген мышц, Кр – креатин, КрФ – креатинфосфат, КК – креатинкиназа, ПВК – пируват, ЛДГ – лактатдегидрогеназа; значения отличий указаны в случае статистически значимых различий при $p < 0,05$

Так, был выявлен сдвиг равновесия в системе креатин↔КрФ в сторону образования креатинфосфата. Кроме того, наблюдалась активация гликогенолиза и гликолиза, что приводило к значительному уменьшению содержания гликогена в тканях (на 31% в печени и 79% в мышцах) и повышению содержания пирувата (на 86%) и активности лактатдегидрогеназы (на 8%) в сыворотке крови. В свою очередь у самцов лабораторных мышей через 72 часа эксперимента отмечена активация углеводного обмена без явного преобладания катаболического или анаболического процесса: было обнаружено понижение (на 12%) содержания гликогена в печени с одновременным увеличением содержания пирувата (на 24%) и активности ЛДГ (на 18%) в сыворотке крови (рис. 20). При этом в скелетных мышцах преобладало запасание энергии: наблюдалось

значительное накопление (в 2,7 раза по сравнению с контролем) гликогена в скелетных мышцах и тенденция к образованию креатинфосфата из креатина.

Влияние МФК на показатели углеводного обмена мелких грызунов в краткосрочном эксперименте изучали в зависимости от различных доз в интервале от 2 мг/кг до 10^{-18} мг/кг с шагом в три порядка с использованием 80 самцов и 80 самок лабораторных мышей, которым однократно подкожно вводили растворы МФК.

Через 72 часа после введения доз МФК в диапазоне от 2 до 10^{-18} мг/кг у самок опытных групп наблюдалось снижение уровня гликогена относительно контроля (максимально на 60 % при введении МФК в дозе 10^{-9} мг/кг), что, вероятно, свидетельствует о воспалительных процессах (рис. 21).

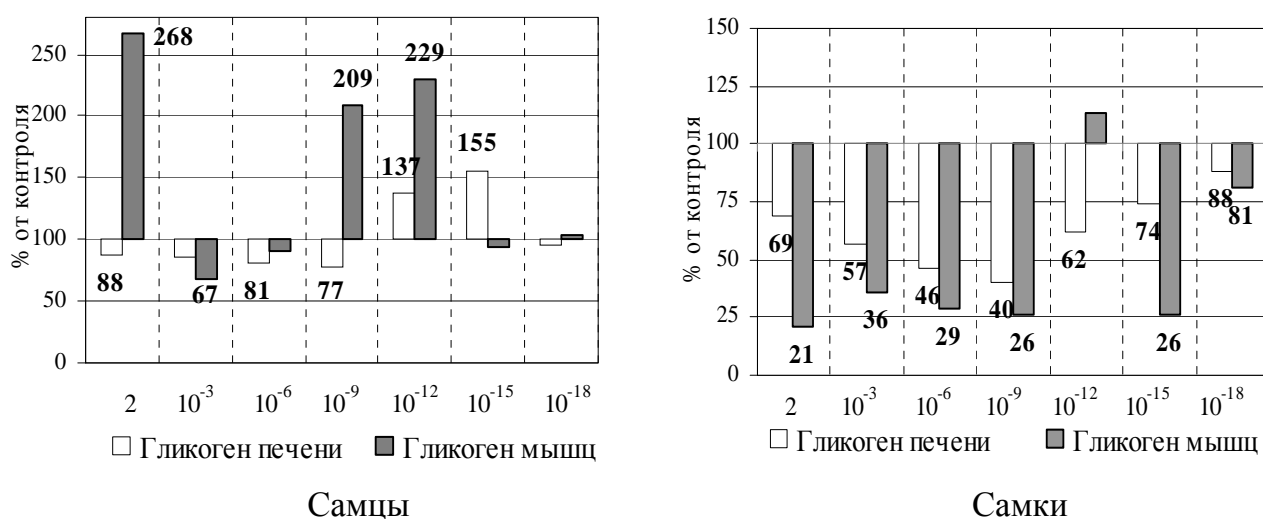


Рис. 21. Содержание гликогена печени и мышц самок и самцов лабораторных мышей опытных групп через 72 часа после подкожного введения различных доз МФК: по оси абсцисс – вводимая доза МФК, мг/кг; значения отличий указаны в случае статистически значимых различий при $p < 0,05$

У самцов опытных групп после введения МФК в дозах от 2 до 10^{-9} мг/кг также наблюдалось понижение содержания гликогена печени (максимально на 23% при введении МФК в дозе 10^{-9} мг/кг). При введении МФК в дозах 10^{-12} и 10^{-15} мг/кг наблюдалось повышение содержания гликогена печени на 37-55%.

Подобная ситуация наблюдалась и в изменении уровня гликогена мышц. Так, у самок отмечено достоверное снижение уровня гликогена мышц относительно контроля при введении всех изучаемых доз МФК (максимально на 79% при введении МФК в дозе 2 мг/кг); у самцов содержание гликогена мышц было понижено (на 33%) только при введении МФК в дозе 10^{-3} мг/кг, а при введении в дозах 2, 10^{-9} и 10^{-12} мг/кг – значительно повышено (в 2,1 – 2,7 раза относительно контроля). Полученные данные позволяют сделать вывод о возможной активации процессов гликогенолиза у самок и о перераспределении катаболических и анаболических процессов в организме самцов.

Также нами было обнаружено, что введение лабораторным мышам различных доз МФК оказывает большее влияние на содержание креатина, чем креатинфосфата (рис. 22). Кроме того, было отмечено, что в основном показатели изменялись у самцов, а наибольшее влияние на данные метаболиты оказывало введение МФК в дозах 10^{-3} и 10^{-12} мг/кг массы животного.

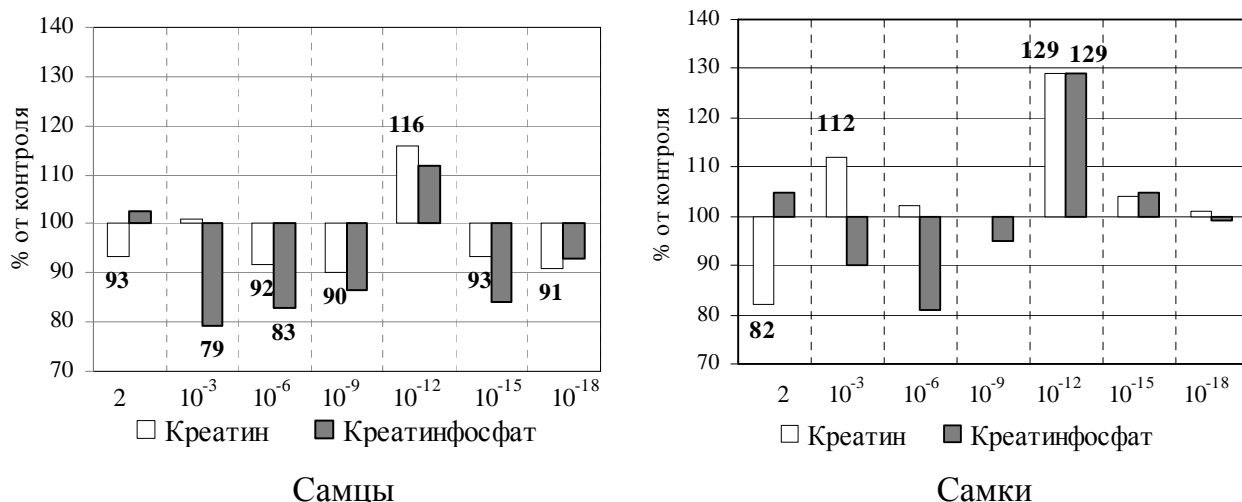


Рис. 22. Содержание креатина и креатинфосфата в мышцах самок и самцов лабораторных мышей опытных групп через 72 часа после подкожного введения различных доз МФК: обозначения - см. рис. 21

При изучении активности КК и ЛДГ обнаружена следующая зависимость от пола особей: у самок введение различных доз МФК оказывает большее влияние на активность КК, а у самцов – на активность ЛДГ (рис. 23). При этом активность КК у мышей опытных групп была понижена по сравнению с контролем: у самок в диапазоне вводимых доз от 2 до 10^{-12} мг/кг (на 23-33%), а у самцов при введении МФК в дозах 10^{-3} и 10^{-6} мг/кг (на 30-32%).

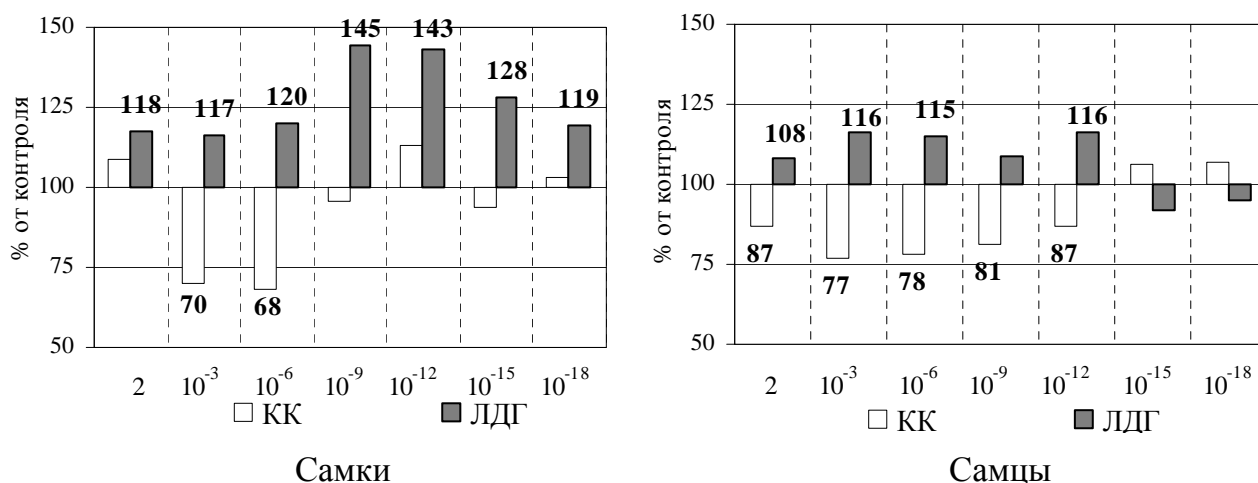


Рис. 23. Активность креатинкиназы и лактатдегидрогеназы в сыворотке крови самок и самцов опытных групп через 72 часа после подкожного введения различных доз МФК: обозначения - см. рис. 21

Пониженные значения активности КК свидетельствуют, возможно, о снижении интенсивности транспорта макроэргов, в том числе АТФ, из митохондрий в цитоплазму. В то же время активность ЛДГ при введении МФК в различных дозах повышалась по сравнению с контролем, что можно объяснить активацией гликолитических процессов.

Анализ изменений концентраций лактата и пирувата в сыворотке крови лабораторных мышей у опытных групп относительно контроля через 72 часа после введения различных доз МФК выявил сходную динамику изменений для данных показателей (рис. 24).

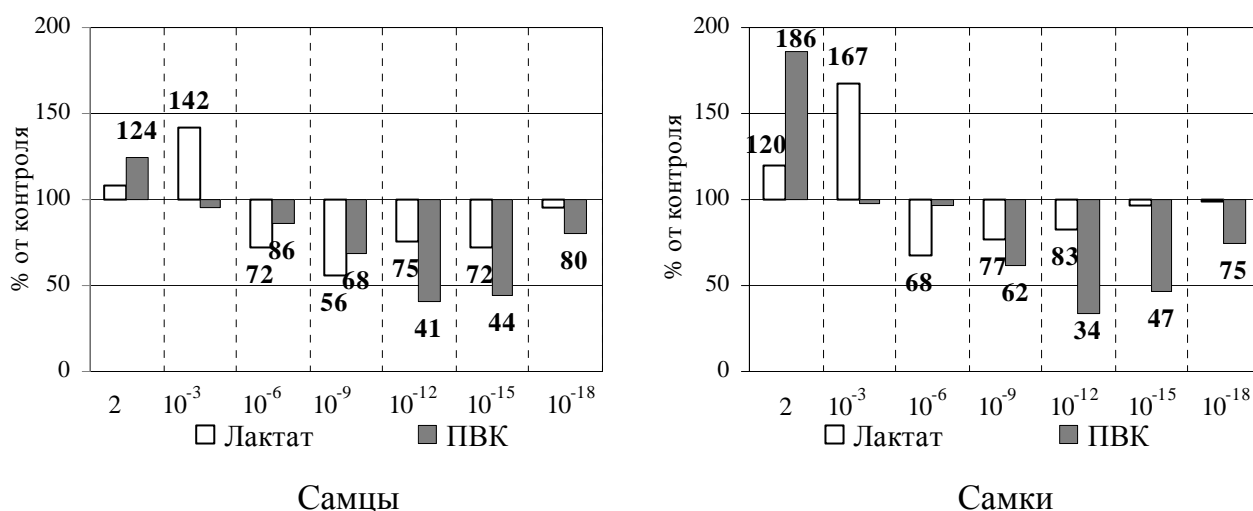


Рис. 24. Содержание лактата и пирувата (ПВК) в сыворотке крови лабораторных мышей опытных групп через 72 часа после введения различных доз МФК: обозначения - см. рис. 21

Нами было обнаружено, что введение лабораторным мышам опытной группы МФК в дозах 2 и 10^{-3} мг/кг приводило к повышению содержания лактата в сыворотке крови (максимально на 67% у самок и на 42% у самцов при введении МФК в дозе 10^{-3} мг/кг). Введение меньших доз приводило к понижению содержания лактата: у самок максимально на 32% при введении МФК в дозе 10^{-6} мг/кг, у самцов максимально на 44% при введении МФК в дозе 10^{-9} мг/кг; за исключением 10^{-18} мг/кг МФК, введение которой не выявило достоверных отличий от контроля.

В свою очередь уровень пирувата в сыворотке крови опытной группы лабораторных мышей превышал контрольные значения при введении МФК в дозе 2 мг/кг (на 86% у самок и на 24% у самцов), а в дозе 10^{-3} мг/кг он достоверно не отличался от контроля. При введении остальных доз наблюдалось достоверное понижение содержания ПВК в сыворотке крови опытных групп лабораторных мышей относительно контроля, причем максимально при введении МФК в дозе 10^{-12} мг/кг: на 66% у самок и 59% у самцов.

Для определения интенсивности и направленности процесса гликолиза рассчитывались отношение лактата (МК) и пирувата (МК/ПВК) и их произведение (МК*ПВК). Для характеристики суммарного содержания продуктов гликолиза вместо суммы было выбрано произведение лактата и ПВК, так как концентрации лактата и ПВК имеют разный порядок значений. Изменение расчетного коэффициента МК*ПВК у животных опытной группы в ходе эксперимента полностью повторяло изменения относительного содержания ПВК (рис. 25).

При введении МФК в дозах 2 и 10^{-3} мг/кг наблюдалось накопление продуктов гликолиза, при понижении вводимой дозы МФК – их расход. Накопление продуктов гликолиза свидетельствует о перераспределении анаэробных и аэробных процессов в сторону преобладания анаэробных.

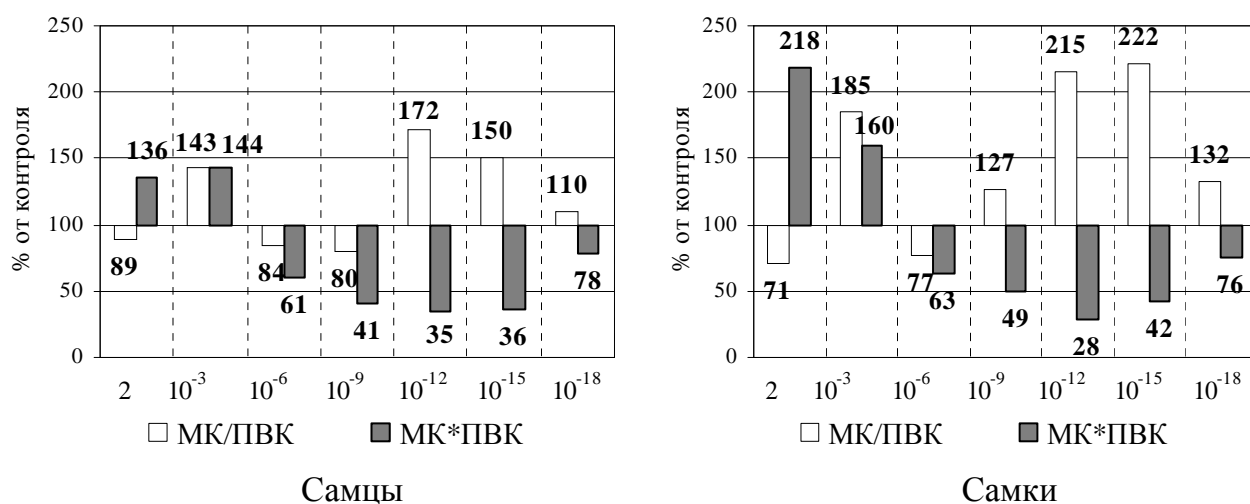


Рис. 25. Соотношение лактата и пирувата (МК/ПВК) и их произведение (МК*ПВК) в сыворотке крови самок и самцов опытных групп через 72 часа после введения различных доз МФК: обозначения - см. рис. 21

Выявленные изменения соотношения лактата и ПВК опытных групп относительно контроля были связаны с изменениями относительного содержания как лактата, так и пирувата. В области низких доз (10^{-9} – 10^{-18} мг/кг) МФК изменения отношений и произведений лактата и ПВК были разнонаправлены – отношение МК/ПВК повышалось (у самок максимально в 2,2 раза при введении МФК в дозе 10^{-15} мг/кг, у самцов в 1,7 раза при введении МФК в дозе 10^{-12} мг/кг), а их произведение понижалось (максимально в 3,6 раза у самок и в 2,9 раза у самцов при введении МФК в дозе 10^{-12} мг/кг) (рис. 25).

В результате проведенных исследований влияния различных доз МФК на биохимические показатели углеводного обмена лабораторных мышей было выявлено наибольшее влияние введения МФК в дозах 10^{-3} и 10^{-12} мг/кг.

Через 72 часа после введения МФК в дозе 10^{-3} мг/кг наблюдалось снижение содержания гликогена в тканях лабораторных мышей, особенно у самок (в

печени на 43 и 14 %, в мышцах на 64 и 33 % у самок и самцов соответственно) вследствие активации гликогенолиза (рис. 26).

У самок лабораторных мышей уровень креатинфосфата имел тенденцию к понижению, а содержание креатина повышалось на 12%, вследствие чего происходило повышение суммарного содержания данных метаболитов в тканях и понижение на 15% соотношения КрФ/Креатин. У самцов же значения креатина не отличались от контрольных, а содержание КрФ в скелетных мышцах снижалось на 21%, следствием чего стало снижение как суммарного показателя, так и соотношения данных метаболитов, что говорит о возможном распаде части КрФ до креатинина.

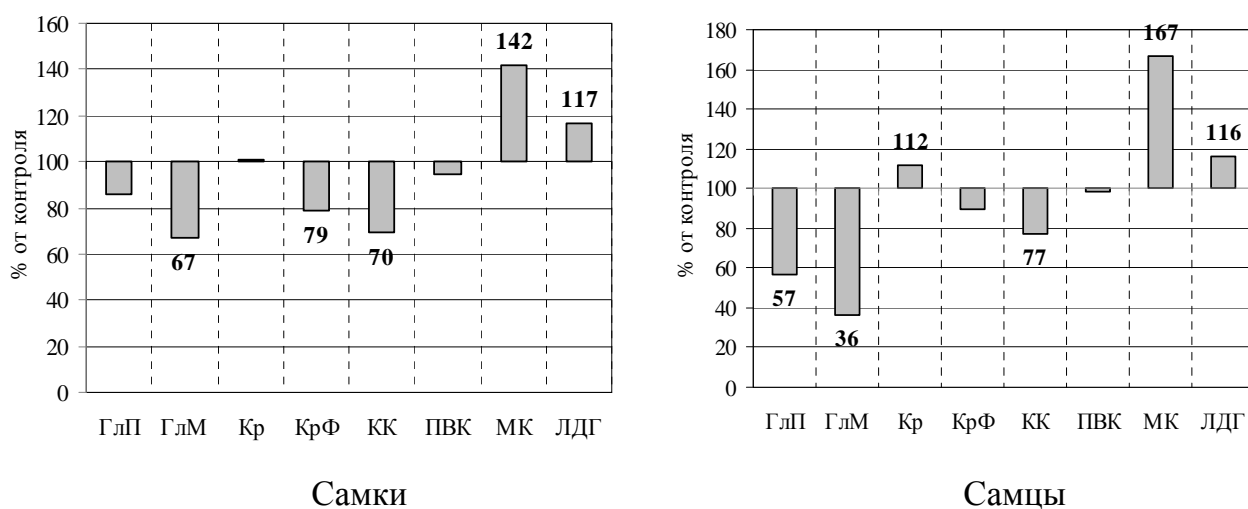


Рис. 26. Биохимические показатели углеводного обмена самок и самцов мышей опытных групп через 72 часа после введения МФК в дозе 10^{-3} мг/кг: ГлП – гликоген печени, ГлМ – гликоген мышц, Кр – креатин, КрФ – креатинфосфоат, КК – креатинкиназа, ПВК – пируват, МК – лактат, ЛДГ – лактатдегидрогеназа; значения отличий указаны в случае статистически значимых различий при $p < 0,05$

В целом данные указывают на активизацию катаболических процессов у лабораторных мышей в ответ на введение МФК в дозе 10^{-3} мг/кг. Учитывая, что уровень пирувата в сыворотке крови не отличался от контрольных значений, а активность ЛДГ и содержание лактата были повышены (ЛДГ на 16-17 %, лактат на 42% у самцов и на 67% у самок), можно сделать вывод, что происходила активация анаэробного гликолиза. Накопление лактата повышало соотношение лактат/пируват (в 1,4 раза у самцов, в 1,9 раза у самок), что свидетельствует о некоторой степени гипоксии [95].

При подкожном введении лабораторным мышам МФК в дозе 10^{-12} мг/кг наблюдались уже более значительные половые отличия (рис. 27).

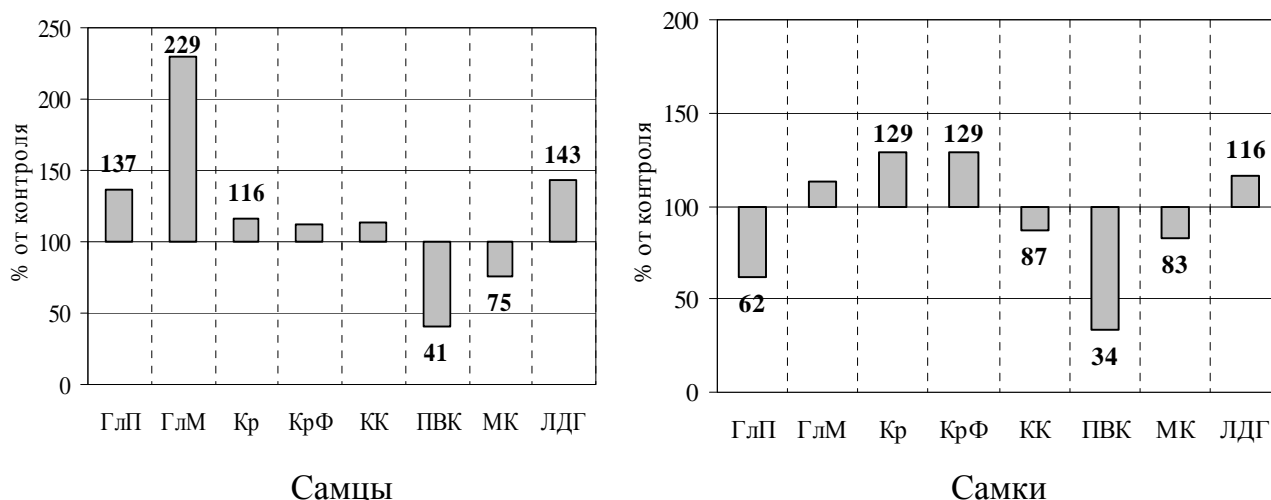


Рис. 27. Содержание биохимических показателей углеводного обмена самок и самцов лабораторных мышей опытных групп через 72 часа после введения МФК в дозе 10^{-12} мг/кг: обозначения - см. рис. 26

Так, у самок содержание гликогена мышц опытной группы достоверно не отличалось от контрольной группы, хотя уровень гликогена в печени еще оставался пониженным (на 38%), а у самцов наблюдалось увеличение содержания гликогена в тканях (в печени на 37%, в мышцах на 129%).

Следовательно, у самок преобладали процессы распада гликогена, а у самцов – его образования. При этом как у самок, так и у самцов наблюдалось значительное уменьшение содержания продуктов гликолиза (суммарное содержание уменьшилось в 3,6 раза у самок и в 2,9 раза у самцов) в основном за счет понижения содержания пирувата (на 66% у самок и на 59% у самцов). Возможно, это свидетельствует о повышении скорости глюконеогенеза. В то же время соотношение МК/ПВК оставалось повышенным (в 1,7 раза у самцов, в 2,1 раза у самок). Содержание креатина и креатинфосфата увеличивалось (относительно контроля на 29% у самок, на 12-16 % у самцов), за счет чего возрастало и их суммарное содержание (на 28% у самок, на 14% у самцов), а соотношение не менялось. Таким образом, проведенное исследование показало, что введение МФК в дозе 10^{-12} мг/кг наибольшее влияние оказывает на биохимические показатели углеводного обмена самок. У самцов восстановление биоэнергетики организма происходит быстрее, наблюдается преобладание анаболических процессов.

Исследование влияния различных доз МФК на биохимические показатели углеводного обмена лабораторных мышей выявило следующую особенность: как для самцов, так и для самок введение высокой (10^{-3} мг/кг) дозы МФК вызывало активацию катаболических процессов, а введение низкой (10^{-12} мг/кг) дозы МФК – анаболических процессов.

Влияние МФК в высоких и низких дозах на углеводный метаболизм мелких грызунов в долговременном эксперименте. Проведенный анализ совокупности полученных данных выявил большую чувствительность самок к введению различных доз МФК. Поэтому для дальнейшего исследования срока возврата биохимических показателей углеводного обмена после введения высокой (10^{-3} мг/кг) и низкой (10^{-12} мг/кг) доз МФК к нормальным величинам были выбраны самки лабораторных мышей линии СВА.

В процессе установления временного промежутка, необходимого для нормализации показателей углеводного обмена у самок после однократного введения МФК в дозах 10^{-3} и 10^{-12} мг/кг, было обнаружено, что при введении высокой дозы МФК (10^{-3} мг/кг) уровень гликогена в тканях нормализуется к 18-м суткам эксперимента, а при введении низкой дозы (10^{-12} мг/кг) – уже к 12-м суткам (рис. 28). При этом пониженное (на 38-43%) содержание гликогена в печени через 3-е суток после введения МФК восстанавливалось к 6-м суткам до уровня контрольных значений, хотя через 12 суток после введения МФК в дозе 10^{-3} мг/кг снова наблюдалось небольшое, но достоверное понижение (на 12%) содержания гликогена в печени.

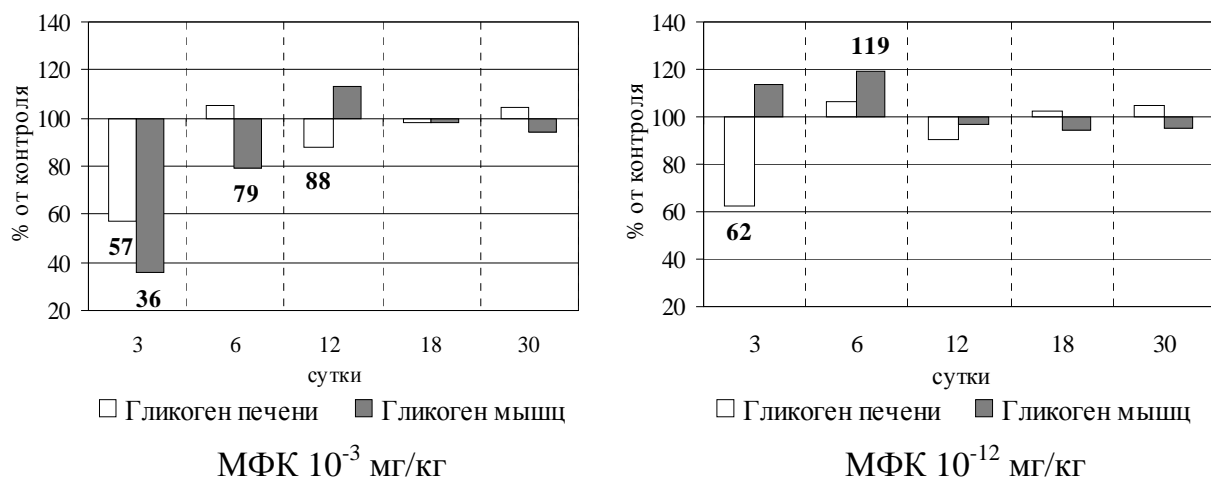


Рис. 28. Содержание гликогена в печени и мышцах самок опытных групп в зависимости от срока после введения МФК: по оси абсцисс – срок эксперимента в сутках после введения МФК; значения отличий указаны в случае статистически значимых различий при $p < 0,05$

Уровень гликогена в мышцах после введения МФК в дозе 10^{-3} мг/кг оставался ниже контрольных значений в течение первых 6-ти суток эксперимента, а в дозе 10^{-12} мг/кг, наоборот, наблюдалась тенденция к повышенному (на 13-19%) содержанию гликогена в мышцах самок мышей.

Содержание креатина и КрФ в скелетных мышцах самок грызунов полностью восстанавливалось к 18-м суткам эксперимента (рис. 29).

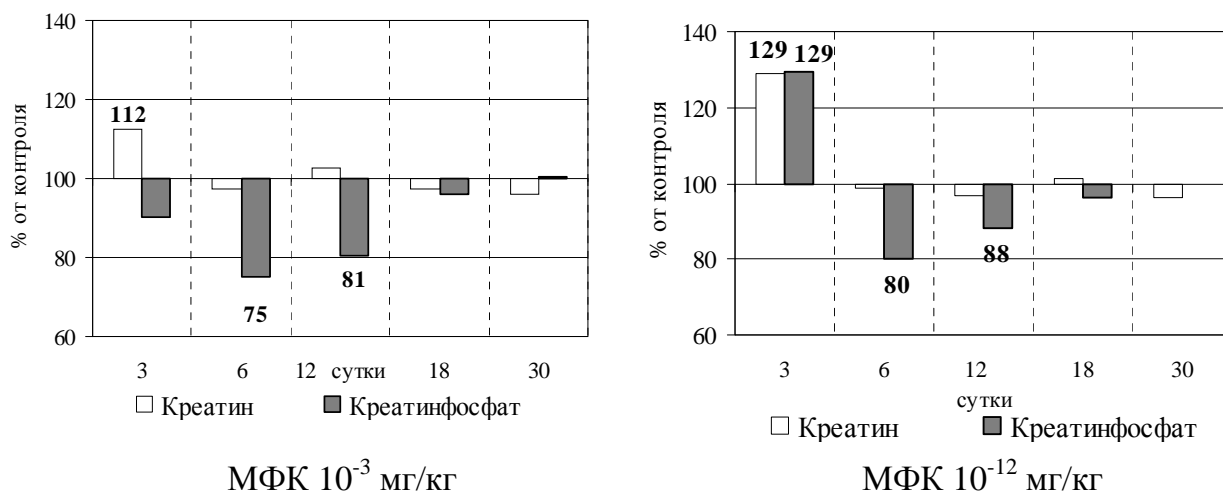


Рис. 29. Содержание креатина и КрФ мышц самок опытных групп относительно контрольной (в %) в зависимости от срока введения МФК; по оси ОХ – сроки эксперимента (сутки после введения МФК); значения отличий указаны в случае статистически значимых различий при $p < 0,05$

Отмечено, что после введения самкам МФК в дозе 10^{-3} мг/кг уровень креатина был повышен только через трое суток, а уровень КрФ, наоборот, оставался ниже контрольных значений вплоть до 12-х суток эксперимента. При введении МФК в дозе 10^{-12} мг/кг через трое суток в скелетных мышцах самок наблюдалось повышение на 29% содержание как креатина, так и КрФ. На 6-е и 12-е сутки эксперимента уровень КрФ был понижен (на 20 и 12% соответственно), в то время как содержание креатина уже достоверно не отличалось от контрольных значений.

Расчетные коэффициенты показали, что через 6 и 12 суток после введения МФК в дозе 10^{-3} мг/кг соотношение КрФ/Креатин, а также их суммарное содержание в скелетных мышцах понижалось за счет уменьшения содержания креатинфосфата, тем более что уровень креатина опытной группы в эти сроки эксперимента от контрольных значений не отличался. Повышение суммарного содержания креатина и креатинфосфата в скелетных мышцах самок через трое суток после введения МФК в дозе 10^{-3} мг/кг (на 5%) было связано уже с увеличением уровня креатина (рис. 30).

Аналогичная ситуация наблюдалась при введении МФК в дозе 10^{-12} мг/кг. Так, через трое суток после введения МФК суммарное содержание креатинфосфата и креатина повышалось (на 28%) за счет повышения уровня обоих метаболитов (рис. 30). Через 6 и 12 суток после введения мы выявили достоверное понижение на 6-9% суммарного содержания и на 9-16% соотношения креатинфосфата и креатина. Данное понижение обусловлено уменьшением уровня креатинфосфата в скелетных мышцах. К 18-м суткам эксперимента приходили в норму как расчетные коэффициенты, так и содержание креатина и креатинфосфата в скелетных мышцах самок лабораторных мышей.

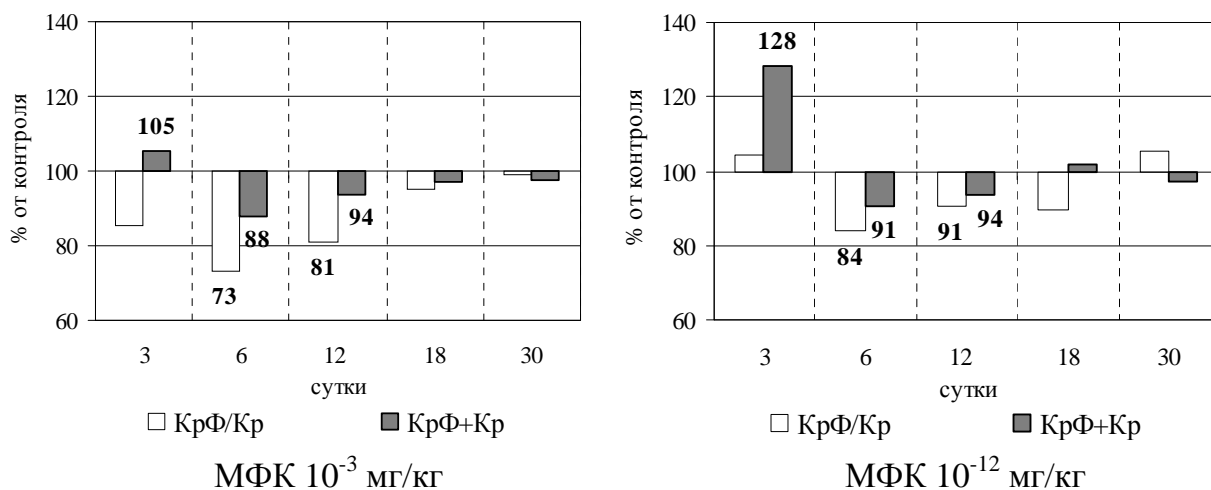


Рис. 30. Соотношение креатинфосфата (КрФ) и креатина (Кр), а также их суммарное содержание в скелетных мышцах самок лабораторных мышей опытных групп в зависимости от срока после введения МФК: обозначения - см. рис. 28

Через трое суток после введения МФК как в высокой (10^{-3} мг/кг), так и в низкой (10^{-12} мг/кг) дозах нами было обнаружено статистически значимое снижение активности креатинкиназы (на 23 и 13 % соответственно) и повышение активности лактатдегидрогеназы (на 16 и 18 % соответственно) в сыворотке крови самок лабораторных мышей. Уже через шесть суток после введения МФК достоверные отличия от контрольной группы отсутствовали.

Содержание продуктов гликолиза (лактата и ПВК) полностью восстанавливалось к 18-м суткам (рис. 31). При этом были выявлены следующие особенности: при введении МФК в дозе 10^{-3} мг/кг через 3 и 6 суток в сыворотке крови самок опытной группы наблюдалось накопление продукта анаэробного гликолиза лактата (на 68 и 10% соответственно), через 12 суток отмечено уменьшение его содержания на 18%; при этом относительное содержание пирувата достоверно не менялось.

Через трое суток после введения МФК в дозе 10^{-12} мг/кг нами было обнаружено значительное уменьшение (на 66%) уровня пирувата в сыворотке крови самок лабораторных мышей, которое, тем не менее, возвращалось до уровня контрольных значений уже через шесть суток эксперимента. В то же время изменение содержания лактата в сыворотке крови имело более сложную динамику. После пониженного (83% относительно контроля) значения на третьи сутки после введения МФК в дозе 10^{-12} мг/кг уже на шестые сутки наблюдалось повышение (128% относительно контроля), а на 12 сутки – опять снижение (93% относительно контроля) уровня лактата в сыворотке крови опытной группы самок лабораторных мышей (рис. 31).

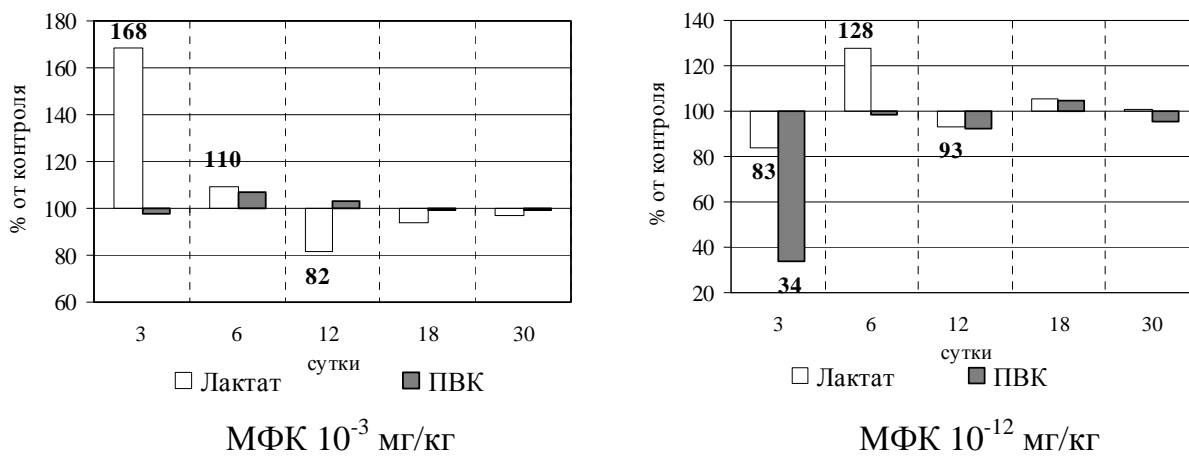


Рис. 31. Содержание лактата (МК) и пирувата в сыворотке крови самок опытных групп в зависимости от срока после введения МФК: обозначения - см. рис. 28

Изменение расчетных коэффициентов (рис. 32) при введении МФК в дозе 10⁻³ мг/кг повторяло динамику изменения лактата (рис. 31) – уменьшение соотношения и суммарного содержания лактата и пирувата сыворотки крови самок опытной группы относительно контрольной от 3-х к 12-м суткам эксперимента.

При введении МФК в дозе 10⁻¹² мг/кг соотношение МК/ПВК значительно повышалось (в 2,1 раза) через трое суток опыта, но снижалось до контрольных значений к 12-м суткам. Суммарное содержание продуктов гликолиза значительно понижалось (на 72%) через трое суток эксперимента, превышало контрольные значения на 24% через шесть суток и снова было достоверно ниже контроля через 12 суток после введения МФК.

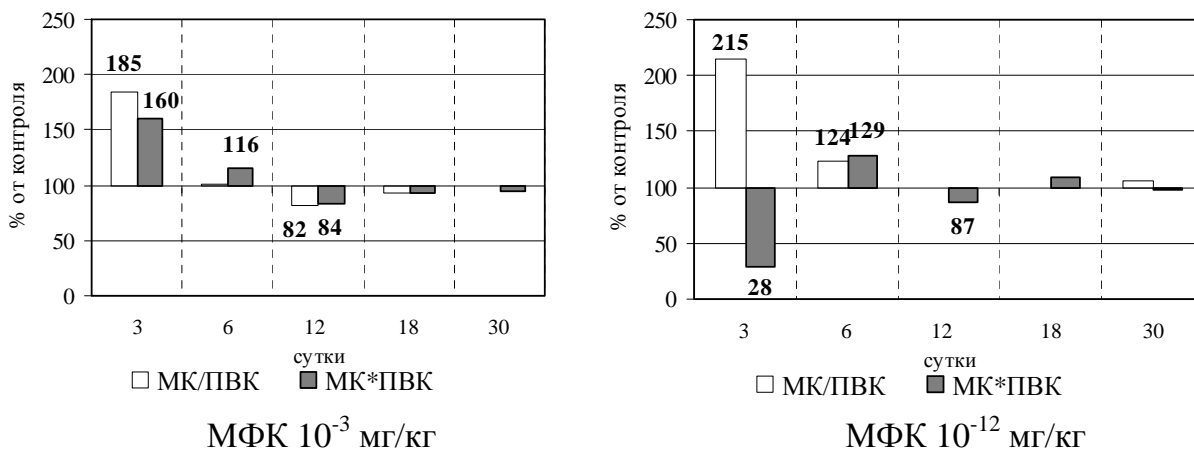


Рис. 32. Соотношение лактата (МК) и пирувата (МК/ПВК) и их произведение в сыворотке крови самок опытных групп в зависимости от срока после введения МФК: обозначения - см. рис. 28

Анализ биохимических показателей углеводного обмена самок после однократного введения МФК в высокой (10⁻³ мг/кг) и низкой (10⁻¹² мг/кг) дозах показал, что изменения показателей проявлялись вплоть до 12-х суток эксперимента. Тем не менее, к 18-м суткам происходила полная нормализация всех изученных биохимических показателей углеводного обмена самок лабораторных мышей.

Таким образом, проведенные исследования показали, что метилфосфоновая кислота в различных дозах и при различной длительности эксперимента оказывает достоверное влияние на биохимические показатели углеводного обмена лабораторных мышей. При этом отмеченные изменения являются обратимыми.

3.3. Метилфосфоновая кислота и особенности липидного обмена у мелких грызунов

Влияние МФК на липидный обмен мелких грызунов в зависимости от времени воздействия в краткосрочном эксперименте изучали в течение 5 суток. По результатам проведенного исследования некоторых показателей крови лабораторных мышей через 12, 24, 48, 72, 96 и 120 часов после введения МФК в дозе 2 мг/кг было обнаружено достоверное изменение исследуемых показателей обмена липидов, ПОЛ и антиоксидантной системы.

Установлено, что через 48 часов после введения МФК у самцов опытных групп наблюдалось существенное увеличение содержания общих липидов на 48% относительно контрольных групп (рис. 33).

Стоит отметить, что для самок через 48 часов характерно уменьшение содержания общих липидов на 17%. Через 72 часа как у самцов, так и у самок наблюдалось снижение на 26 и 17% соответственно. Однако только у самцов через 120 часов отмечено уменьшение содержания общих липидов на 26%. Достоверные отличия содержания холестерина наблюдались для опытной группы самцов через 12 часов (снижение на 9%), через 24 часа (увеличение на 22%) и через 120 часов (уменьшение на 20%). У самок через 24 часа выявлено снижение на 17%, а спустя 48 часов повышение на 16%.

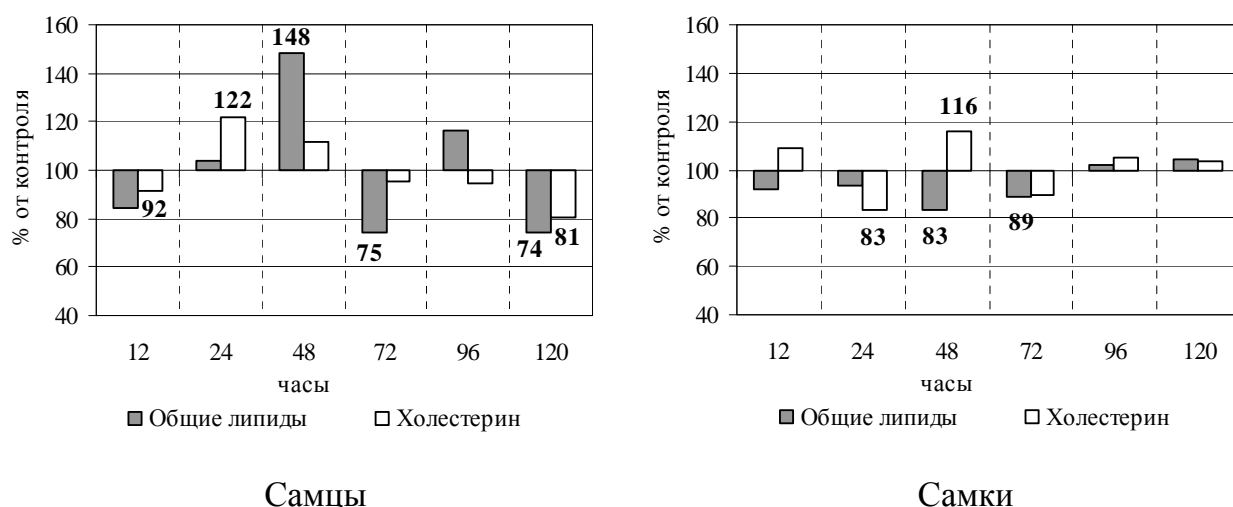


Рис. 33. Изменения содержания общих липидов и холестерина в плазме крови самцов и самок в зависимости от времени после введения МФК в дозе 2 мг/кг: значения отличий указаны в случае статистически значимых различий при $p < 0,05$

Особый интерес вызывает отличие, выявленное в опытных группах через 24 часа после введения МФК, когда для самцов характерно повышение уровня холестерина, а для самок - понижение. Подобная особенность была отмечена и для содержания общих липидов. Она обусловлена половыми различиями в обмене и транспорте липидов [84].

Введение МФК в дозе 2 мг/кг оказывало влияние на уровень обмена липидов у самцов и самок. Это влияние наиболее проявлялось на 2-3 сутки после введения МФК и было более ярко выражено у самцов.

При изучении количества малонового диальдегида (МДА) – вторичного продукта ПОЛ – нами было выявлено (рис. 34), что у самцов после введения МФК наблюдалось достоверное снижение уровня МДА через 12, 24 и 72 часа на 37, 27 и 30% соответственно; однако через 120 часов происходило увеличение МДА на 12%. У самок снижение содержания МДА в плазме крови отмечено через 48 часов после введения МФК на 30 % и через 72 часа на 35%. Важно обратить внимание на то, что уменьшение содержания МДА свидетельствует о снижении интенсивности процессов перекисного окисления липидов.

Исследование активности СОД в эритроцитах выявило (рис. 34), что у самцов через 12 часов после введения МФК наблюдалось снижение активности СОД на 22% относительно контрольной группы, через 24 часа происходило резкое повышение на 74 %, через 48 часов – снижение на 33 %. По прошествии 72 часов активность СОД увеличилась на 14 %. В дальнейшем (96 и 120 ч) активность СОД была повышена на уровне тенденции.

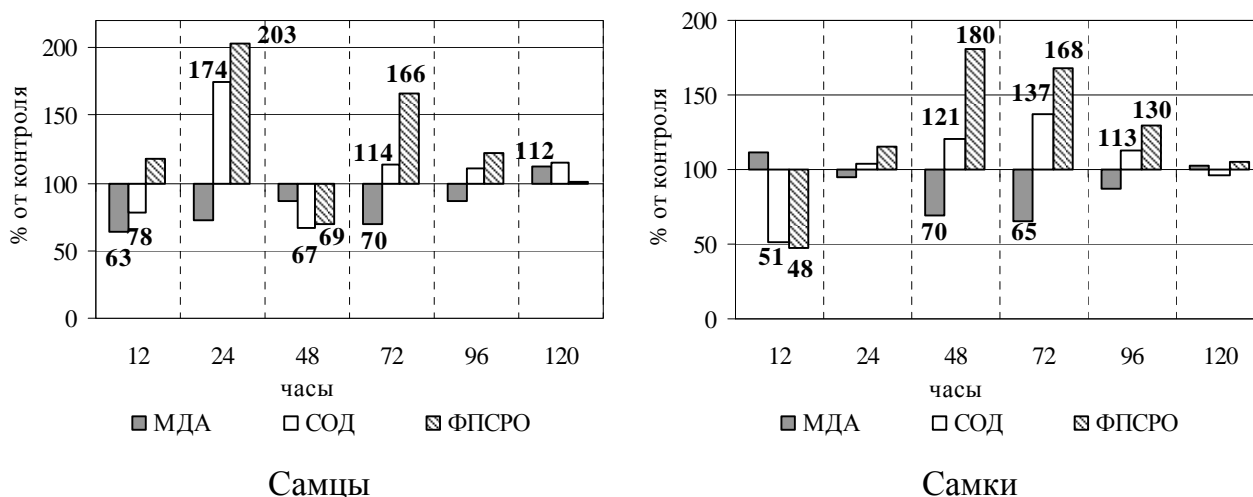


Рис. 34. Изменение содержания малонового диальдегида (МДА) в плазме крови, активности эритроцитарной СОД и ФПСРО в плазме самцов в зависимости от времени после введения МФК в дозе 2 мг/кг: обозначение - см. рис. 33

Для самок спустя 12 часов после введения МФК наблюдалось существенное снижение активности СОД на 49 % относительно контрольных групп. К 24 часам отмечена нормализация активности СОД. Затем через 48 часов наблюда-

лось увеличение активности на 21%. Через 72 часа увеличение активности СОД достигало максимального значения и составляло 137% относительно активности фермента у самок контрольной группы. Через 96 часов активность оставалась увеличенной на 13%. К 120 часам активность СОД нормализовалась. Исходя из представленных выше результатов, можно заключить, что подкожное введение МФК в дозе 2 мг/кг приводило к достоверному изменению активности СОД у самцов и самок лабораторных мышей. Максимальное снижение наблюдалось у самцов через 12 и 48 часов, а увеличение было выявлено через 24 и 72 часа. У самок также наблюдалось существенное достоверное снижение активности СОД через 12 часов, а максимальное увеличение происходило через 72 часа.

Для оценки процессов свободнорадикального окисления и статуса антиоксидантной системы мы воспользовались функциональным показателем свободнорадикального окисления (ФПСРО), разработанным Ю.В. Абакумовой и Н.А. Ардаматским [1, 2, 7, 8, 277]. Авторы определили ФПСРО как отношение активности СОД к концентрации МДА (СОД/МДА). Наши исследования показали (рис. 34), что у самцов в опытных группах ФПСРО волнообразно изменялся в зависимости от времени эксперимента.

Так, к 24 часам после введения МФК наблюдалось максимальное увеличение показателя, которое составляло 103% от значения в контрольной группе, через 48 часов отмечалось резкое уменьшение на 31%. К 72 часам ФПСРО превышал значение показателя в контрольной группе на 66%. На четвертые и пятые сутки значение ФПСРО в опытных группах самцов достоверно не отличалось от значений в контрольных группах. Для опытной группы самок в сравнении с контрольной было выявлено уменьшение ФПСРО через 12 часов после введения МФК, затем через 24 часа наблюдалось недостоверное повышение. К 48 часам ФПСРО достиг максимального увеличения, которое составило 80%. Затем была выявлена тенденция к уменьшению величины ФПСРО: через 72 часа превышение относительно контрольной группы составляло 68%, через 96 часов – 30%. К 120 часам величина ФПСРО достоверно не отличалась от величины в контрольной группе самок. Таким образом, подкожное введение МФК в дозе 2 мг/кг приводило к достоверному изменению ФПСРО как у самцов, так и у самок лабораторных мышей. Характер изменения у самцов и самок отличался, что связано с половыми особенностями процессов перекисного окисления и системы антиоксидантной защиты млекопитающих [5, 119, 236]. Существенное уменьшение ФПСРО наблюдалось у самок через 12 часов и у самцов через 2-е суток, однако уровень МДА оставался в пределах значений контрольных групп. Значительное увеличение ФПСРО у самцов было выявлено на 1-е и 3-и сутки эксперимента, у самок – на 2-е и 3-и. Высокие значения ФПСРО указывают на снижение интенсивности процессов свободнорадикального окисления за счет работы АОС. Это было подтверждено высокой

активностью СОД в вышеперечисленные временные этапы эксперимента и снижением уровня МДА. Однако процессы свободнорадикального окисления в организме млекопитающих являются важнейшим звеном поддержания гомеостаза организма. Как снижение, так и увеличение их интенсивности может привести к нарушениям в работе клеток и органов [13, 33, 89, 133].

МФК в дозе 2 мг/кг оказывала влияние на показатели липидного обмена, ПОЛ и АОС лабораторных мышей обоих полов. Характер влияния у самцов и самок отличался, что связано с половыми особенностями обмена липидов, процессов ПОЛ и системы антиоксидантной защиты млекопитающих. Это влияние у самцов было выражено несколько больше чем у самок.

Достоверные изменения большинства исследуемых показателей относительно контрольных групп наблюдались у лабораторных мышей обоих полов через 72 часа после подкожного введения МФК в дозе 2 мг/кг.

При исследовании влияния различных доз МФК при подкожном введении выявлены достоверные отличия показателей липидного обмена, перекисного окисления липидов и АОС от значений контрольных групп.

При анализе полученных данных о влиянии различных доз МФК на показатели липидного обмена самцов и самок лабораторных мышей можно отметить ряд закономерностей. Так, к достоверному повышению количества общих липидов в плазме крови у самцов на 28% и у самок на 31% приводило введение МФК в дозе 10^{-15} мг/кг, а введение в дозе 2 мг/кг вызывало достоверное снижение на 26% и 11% соответственно (рис. 35).

Стоит отметить, что дозы 10^{-3} и 10^{-9} мг/кг вызывали достоверные изменения (увеличение) количества общих липидов только у самцов на 20% и 55%. Изменения содержания холестерина – повышение было характерно только для самцов при введении МФК в дозах 10^{-3} и 10^{-9} мг/кг.

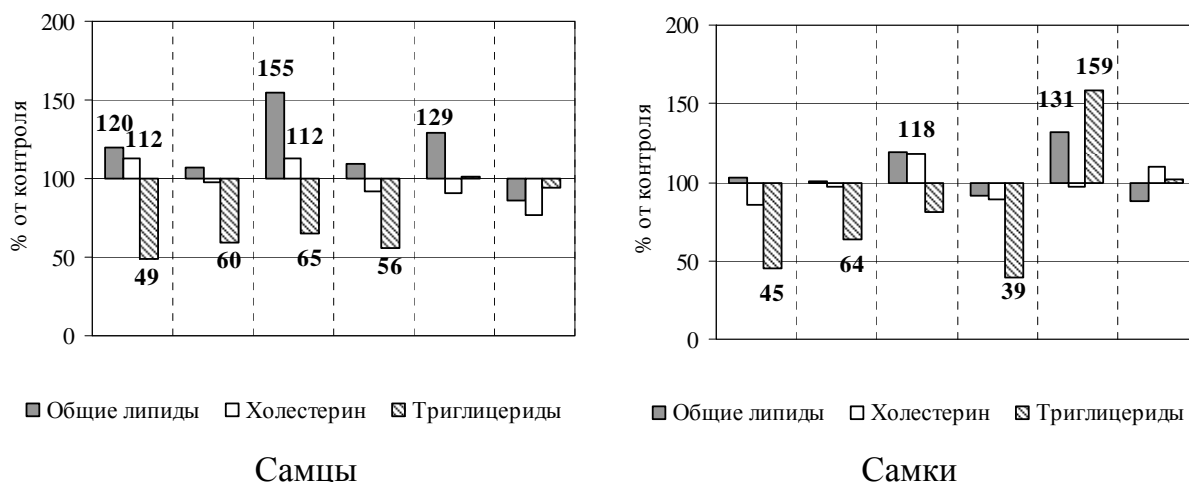


Рис. 35. Изменение содержания общих липидов, холестерина и триглицеридов в плазме крови самцов и самок через 72 часа в зависимости от вводимых доз МФК: обозначения - см. рис. 33

Изменения были обнаружены в уровне триглицеридов у мышей обоих полов. Так, введение МФК в дозах 10^{-3} , 10^{-6} и 10^{-12} мг/кг приводило к существенному снижению уровня триглицеридов в плазме крови лабораторных мышей у самцов на 52%, 40%, 44% и у самок на 55%, 36%, 61% соответственно. При введении МФК в дозе 10^{-9} мг/кг наблюдалось снижение содержания триглицеридов только у самцов на 35%. Также только у самок было выявлено существенное повышение уровня триглицеридов при введении МФК в дозе 10^{-15} мг/кг до 159% относительно контроля.

Колебания таких показателей, как общие липиды, холестерин и триглицериды, свидетельствуют о серьезных изменениях в обмене липидов [84, 110, 120]. Известно, что гипотриглицеридемия наблюдается при нарушении транспорта липидов, гипертиреозах, поражении паренхимы печени, а также при введении никотиновой кислоты [84, 153, 256]. Повышение уровня холестерина может быть связано с нарушением его транспорта [84, 116] либо с повреждением мембран клеток [31, 32].

Введение МФК в дозах 2 и 10^{-15} мг/кг приводило к существенному снижению уровня МДА в плазме крови: у самцов на 30 и 42%, у самок на 35 и 31% соответственно (рис. 36). Тогда как введение МФК в дозе 10^{-9} мг/кг вызывало увеличение уровня МДА у самцов на 33% и у самок на 29%.

Введение самцам МФК в дозах 2, 10^{-3} , 10^{-6} , 10^{-12} и 10^{-15} мг/кг вызывало повышение активности СОД (рис. 36). У самок повышение активности СОД наблюдалось только при введении МФК в дозах 2 и 10^{-3} мг/кг на 37% и 14% соответственно, а доза 10^{-9} мг/кг вызывала снижение активности СОД на 31%.

Ними было выявлено достоверное изменения ФПСРО как у самцов, так и у самок лабораторных мышей при введении МФК в различных дозах. Уменьшение ФПСРО наблюдалось при введении дозы $1 \cdot 10^{-9}$ мг/кг как у самцов (на 29%), так и у самок (на 52%), что свидетельствует о нарушении в работе АОС, т.к. происходит накопление МДА при сниженной (самки) или нормальной (самцы) активности СОД. Увеличение ФПСРО было отмечено у мышей обоего пола при введении МФК в дозах 2, 10^{-3} и 10^{-15} мг/кг, причем наибольшее влияние оказывала доза 10^{-15} мг/кг – у самцов ФПСРО был повышен на 129% относительно контроля, а у самок – на 86%. Также стоит отметить, что только у самцов доза 10^{-12} мг/кг вызывала увеличение ФПСРО. Высокие значения ФПСРО указывают на снижение интенсивности процессов перекисного окисления и повышенную активность АОС.

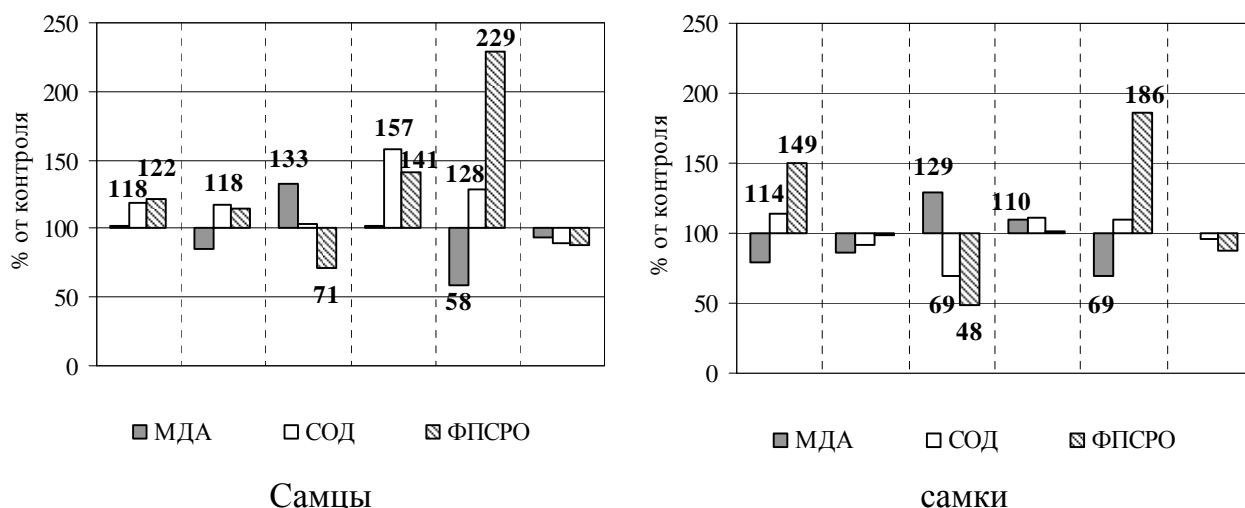


Рис. 36. Изменение содержания МДА в плазме крови, активности эритроцитарной СОД и ФПСРО в плазме крови самцов и самок через 72 часа после введения различных доз МФК: обозначения - см. рис. 33

Исходя из всего вышесказанного, можно заключить, что МФК оказывает наибольшее влияние на самцов в дозах 2, 10^{-9} , 10^{-15} мг/кг и на самок в дозах 2 и 10^{-15} мг/кг. Установлено, что МФК в дозе 10^{-18} мг/кг не оказывает влияния на показатели обмена липидов, ПОЛ и АОС лабораторных мышей.

При изучении изменений, вызванных однократным введением МФК в дозах 2 и 10^{-15} мг/кг самкам лабораторных мышей на протяжении 30 суток, были обнаружены следующие закономерности.

МФК в дозе 2 мг/кг оказывала влияние на показатели обмена липидов в течение 12 суток. Так, через 3 и 12 суток после введения МФК наблюдалось снижение уровня общих липидов в плазме крови на 11% и 40% соответственно (рис. 37). Достоверное изменение холестерина, снижение на 23% было отмечено по прошествии 12 суток эксперимента. Количество триглицеридов было достоверно повышено на 51% через 6 суток после введения МФК, а через 12 суток снижено на 26%. Через 18 и 30 суток достоверных изменений отмечено не было.

МФК в дозе 10^{-15} мг/кг оказывала влияние на показатели обмена липидов в течение 6-ти суток (рис. 37). Так, на 3 и 6 сутки после введения МФК наблюдалось увеличение уровня общих липидов в плазме крови на 31% и 20%.

Достоверное изменение холестерина не отмечено на всем временном интервале эксперимента. Количество триглицеридов было достоверно повышено через 3 суток на 59% и через 6 суток на 84%. На 12, 18 и 30 сутки можно констатировать отсутствие влияния МФК в дозе 10^{-15} мг/кг на исследуемые показатели липидного обмена.

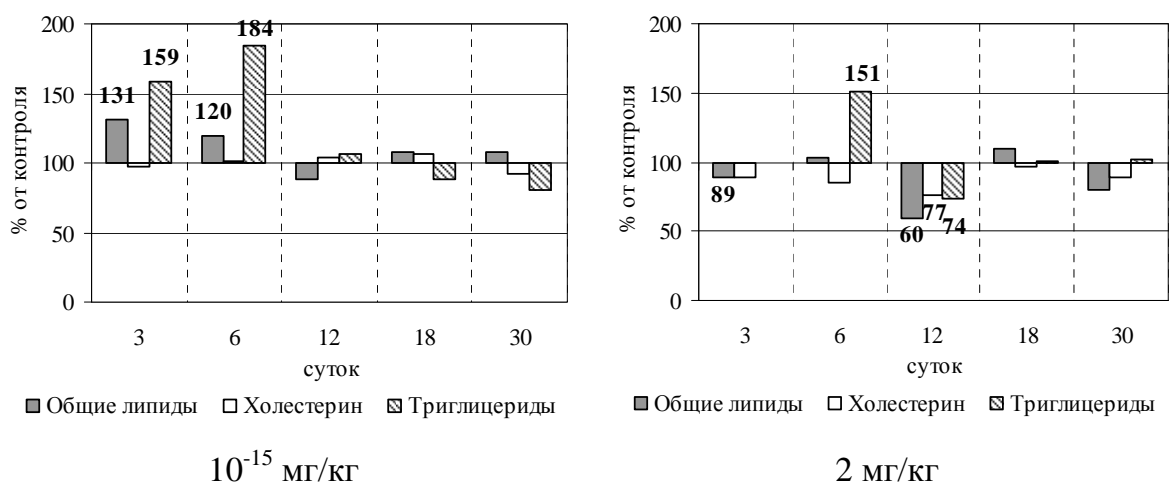


Рис. 37. Изменение содержания общих липидов, холестерина и триглицеридов в плазме крови самцов и самок через 72 часа после введения различных доз МФК: обозначения - см. рис. 33

Введение МФК в дозах 2 и 10^{-15} мг/кг приводило к достоверному изменению уровня МДА в плазме крови самок лабораторных мышей на всем протяжении эксперимента (рис. 38).

Так, на 3, 6 и 18 сутки эксперимента при введении дозы 2 и 10^{-15} мг/кг было обнаружено снижение уровня МДА от 22 до 40% относительно контроля. Например, наибольшее снижение наблюдалось через 18 суток при введении дозы 2 мг/кг на 40% и через 3 суток после введение дозы 10^{-15} мг/кг на 31%. Снижение количества МДА в крови говорит о снижении интенсивности процессов перекисного окисления липидов. Также было выявлено, что только доза 2 мг/кг вызывала активацию образования МДА: это наблюдалось по прошествии 12 суток эксперимента, увеличение относительно контроля составляло 21%. Особо стоит отметить то, что на 30 сутки после введения МФК в дозах 2 и 10^{-15} мг/кг наблюдалось повышенное содержание МДА на 30% и 39% соответственно.

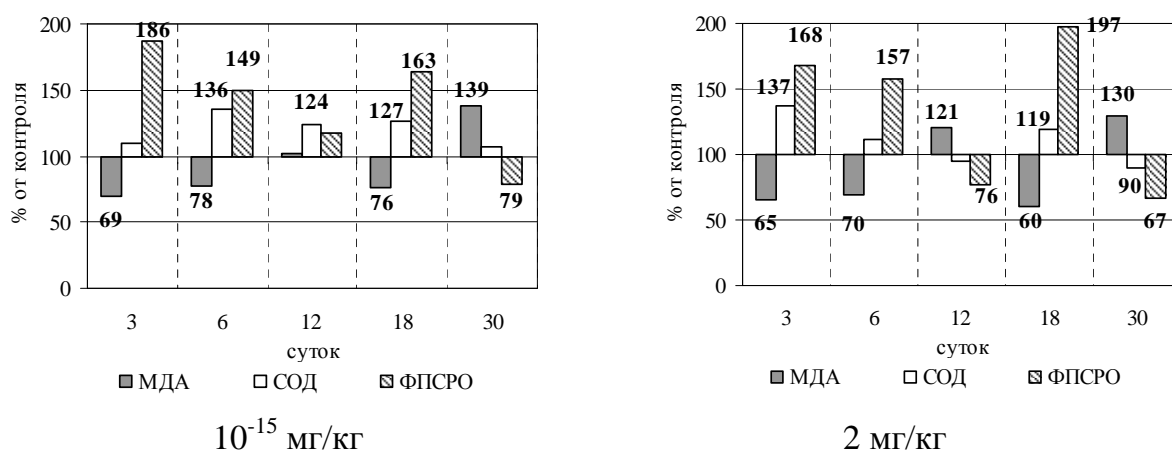


Рис. 38. Содержание МДА в плазме крови, активность эритроцитарной СОД и ФПСРО опытных групп самок в течение 30 суток после введения МФК: по оси абсцисс – сроки эксперимента; значения отличий указаны в случае статистически значимых различий при $p < 0,05$

Введение МФК в обеих исследуемых дозах приводило к изменению активности ферментов АОС у самок лабораторных мышей (рис. 38, 39).

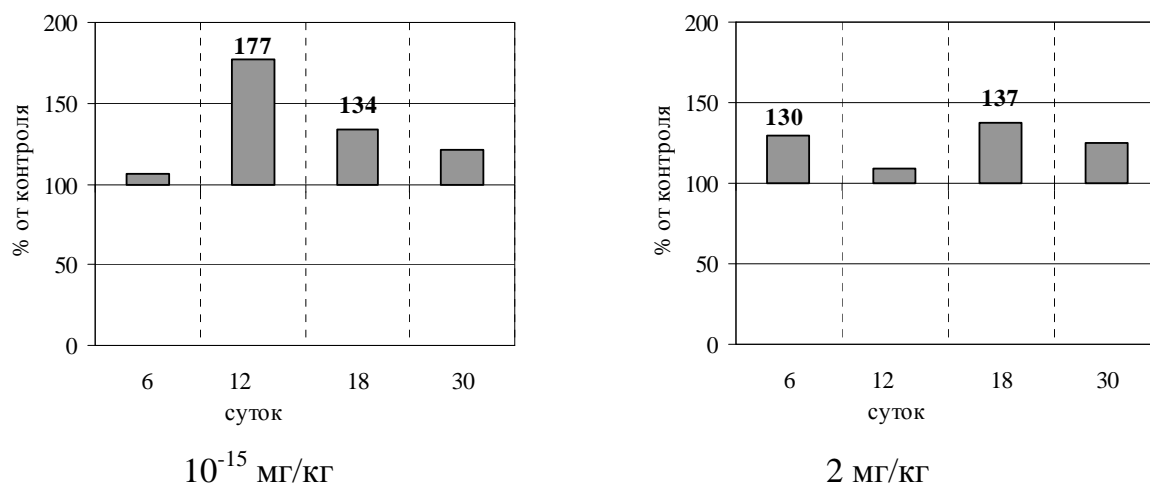


Рис. 39. Активность каталазы в плазме крови самок опытных групп в течение 30 суток после введения МФК: обозначения - см. рис. 38

При введении дозы 2 мг/кг наблюдалось увеличение активности СОД через 3 суток на 37%, каталазы через 6 суток на 30%, также было отмечено одновременное повышение активности обоих ферментов по прошествии 18 суток эксперимента на 19% и на 37%. МФК в дозе 10^{-15} мг/кг вызывала увеличение активности СОД через 6 суток на 36%. Через 12 суток и 18 суток также было обнаружено одновременное повышение активности СОД на 29% и 27%, каталазы на 77% и 34% соответственно.

При анализе результатов расчета ФПСРО у самок лабораторных мышей при однократном введении МФК в дозах 2 и 10^{-15} мг/кг нами было выявлено существенное увеличение значений ФПСРО через 3, 6 и 18 суток после введения МФК на 50-98% (рис. 38). Также нами было обнаружено снижение ФПСРО относительно контроля через 12 суток только у самок с введением дозы 2 мг/кг на 24% и через 30 суток для самок с введением обеих доз.

Колебания показателей ПОЛ и АОС говорят о процессах адаптационных изменений в организмах самок лабораторных мышей [13, 109, 160, 186, 187, 269].

Исходя из всего вышесказанного, можно заключить, что нормализация исследованных показателей обмена липидов самок лабораторных мышей при введении МФК в дозе 2 мг/кг наступает к 18-м суткам эксперимента, а при введении в дозе 10^{-15} мг/кг – к 12-м суткам. Активность ферментов АОС у самок не отличается от значений контрольной группы на 30 сутки эксперимента. Однако содержание МДА на 30-е сутки оставалось существенно повышенным, что говорит об истощении резервов АОС или нарушении процессов адаптации.

При анализе полученных результатов в целом нами было отмечено, что наиболее чувствительными показателями к воздействию МФК являются: количество триглицеридов в плазме крови, уровень МДА в плазме крови, активность каталазы плазмы крови и активность СОД эритроцитов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В современном мире при использовании в повседневной жизни десятков новых органических веществ, не имеющих аналогов в природе, особую значимость приобретает определение токсичности как самих веществ, так и отходов. Важность этого вопроса обозначена в нормативном документе – санитарных правилах СП 2.1.7.1386-03. Согласно п. 5.6.5 СП 2.1.7.1386-03, «санитарно-токсикологический эксперимент проводится с целью установления степени проявления возможного токсического действия отхода при длительной интоксикации организма его экстрактом. Воздействие отхода на организм оценивается по статистически достоверным изменениям показателей функционального состояния организма (гематологическим, биохимическим, иммунологическим и др.)». Однако это важнейшее направление в настоящее время практически не подкреплено нормативными документами, методическими рекомендациями или аттестованными методиками измерений.

В экотоксикологических исследованиях важнейшее место принадлежит изучению биохимических показателей крови теплокровных организмов, которые могут быть использованы для разработки оперативных методов контроля за состоянием здоровья населения, проживающего в районах с неблагоприятной экологической обстановкой и в зонах расположения опасных химических производств.

Малые и сверхмалые дозы продуктов трансформации отравляющих веществ, ксенобиотиков, которые безопасны в рамках санитарно-гигиенических нормативов и которые сложно идентифицировать по стандартным методикам количественного химического анализа, могут являться значимыми для экосистем. Это связано со сложностью и порой высокой стоимостью химических анализов, а также с фактом, что некоторые вещества могут быть весьма токсичными уже при низких концентрациях и не фиксироваться известными приборами.

Эти вопросы особенно актуальны в настоящее время, когда в России идет планомерное широкомасштабное уничтожение химического оружия в рамках выполнения федеральной целевой программы «Уничтожение запасов химического оружия в Российской Федерации». Среди отравляющих веществ, подлежащих уничтожению, зарин, зоман и ви-икс являются фосфорорганическими соединениями класса фосфонатов.

Важнейшим направлением является поиск биохимических маркеров метаболизма при воздействии различных ксенобиотиков в малых дозах.

В результате выполненной работы была проведена комплексная биохимическая оценка метаболизма лабораторных мышей линии СВА при интоксикации фосфорорганическими ксенобиотиками на примере метилфосфоновой

кислоты в различных дозах, в том числе малых, определен комплекс наиболее информативных показателей, которые можно использовать при определении состояния живых организмов в экологическом мониторинге состояния теплокровных организмов.

Анализ полученных результатов выполненной работы по выявлению биологической активности метилфосфоновой кислоты на теплокровный организм лабораторных мышей выявил следующие закономерности.

МФК оказывает влияние на основные метаболические процессы у лабораторных мышей линии СВА. При подкожном введении метилфосфоновой кислоты в дозе 2 мг/кг массы животного в остром эксперименте максимальное изменение изучаемых биохимических показателей наблюдалось через трое суток.

МФК обладает ярко выраженным дозозависимым эффектом. Установлено, что у самцов и самок лабораторных мышей наибольшие изменения в биохимических показателях метаболических процессов происходили после введения метилфосфоновой кислоты в высоких (2 и 10^{-3} мг/кг) и низких (10^{-12} и 10^{-15} мг/кг) дозах.

Действие высоких доз метилфосфоновой кислоты приводило в основном к интенсификации работы антиоксидантной системы и активации катаболических процессов основных энергетических субстратов. Увеличивалась активность супероксиддисмутазы (важнейшего фермента антиоксидантной системы) в среднем на 20%, что сопровождалось снижением в среднем на 30% уровня продуктов перекисного окисления белков и липидов. Резко (в 1,5-2,8 раза) снижался уровень гликогена в тканях при увеличении лактата на 40-70%; уменьшалось содержание общих липидов на 15-20%, в том числе на 50% триглицеридов. Кроме того, до 20-40% снижалось содержание маркеров эндогенной интоксикации, что можно связать с нарушением мембранного транспорта, вызванного изменением в пространственном строении клеточных мембран за счет их физического и, возможно, химического взаимодействия с метилфосфоновой кислотой, обладающей специфическими свойствами, в том числе бифильностью.

Характер воздействия на метаболические процессы мелких грызунов низких доз (10^{-12} и 10^{-15} мг/кг массы животного) метилфосфоновой кислоты является регуляторным. Введение мышам низких доз метилфосфоновой кислоты сопровождалось активацией анаболических процессов энергетического обмена, приводя к повышению содержания общих липидов на 30%, гликогена в печени и мышцах в 1,5-2,3 раза и уменьшению в 2,8-3,5 раза суммарного содержания продуктов гликолиза. На фоне этого ускорялись процессы окислительной модификации белков, вызывая повышение уровня маркеров эндогенной интоксикации на 30-90% и продуктов перекисного окисления белков на 20-80%, не-

смотря на повышение активности супероксиддисмутазы и снижение на 30-40% уровня маркера перекисного окисления липидов малонового диальдегида.

По результатам изучения влияния более низких доз метилфосфоновой кислоты – 10^{-18} мг/кг – на показатели метаболизма мышей выявлено, что в дозах такого порядка МФК практически не оказывает влияния на показатели энергетического, липидного и белкового обмена. Однако было отмечено, что после введения МФК в дозе 10^{-18} мг/кг массы животного уровень веществ низкой и средней молекулярной массы в плазме оставался повышенным на 35-45% как у самцов, так и у самок. Это может возникать только при нарушении очень тонких механизмов регуляции метаболических процессов, например, на уровне аденилатциклазной системы.

При изучении биохимических показателей в течение месяца после однократного введения мышам метилфосфоновой кислоты в высоких и низких дозах было выяснено, что этот ксенобиотик вызывает обратимые изменения основных метаболических процессов у мелких грызунов. Это подтверждается нормализацией некоторых показателей к 18-м суткам и большинства показателей к 30-м суткам эксперимента. Исключение составили продукты перекисного окисления белков и липидов, концентрация которых в крови грызунов осталась повышенной даже через 30 суток после введения низкой дозы метилфосфоновой кислоты. Если учесть, что активность ферментов антиоксидантной системы в этот период не отличалась от значений контрольной группы, то можно предположить, что введение МФК приводит к истощению резервов антиоксидантной системы.

Были выявлены половые различия при изучении биохимических показателей метаболизма у мышей в ответ на введение метилфосфоновой кислоты. У особей женского пола защитная система стрессовых ответов для компенсации вредного воздействия эндотоксинов и ксенобиотиков, в том числе метилфосфоновой кислоты, более активна, чем у особей мужского пола. Для самцов после введения метилфосфоновой кислоты как в высоких, так и в низких дозах характерны более значимые изменения биохимических показателей метаболизма, особенно белкового.

Результаты проведенных исследований показали, что для мелких грызунов в качестве биомаркеров присутствия фосфорорганических соединений ряда фосфонатов в природных средах можно рекомендовать гликоген в тканях, лактат и пируват в сыворотке крови, продукты перекисного окисления белков и липидов, триглицериды, олигопептиды и среднемолекулярные молекулы в плазме, активность эритроцитарной супероксиддисмутазы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абакумова Ю. В. Об инфекционной природе инфаркта миокарда // Медико-биологический вестник им. Я.Д. Витебского. 1998. № 1. С. 15.
2. Абакумова Ю.В. Физиологическое и патологическое свободнорадикальное окисление: сущность, методика распознавания, теоретическое и практическое значение // Врачевание и его методология. Саратов, 1996. 33с.
3. Абрамова Ж.И., Оксенгендлер Г.И. Человек и противоокислительные вещества. Л.: Наука, 1985. 230 с.
4. Александров В.Н., Емельянов В.И. Отравляющие вещества. М.: Воениздат, 1990. 268 с.
5. Анищенко Т.Г., Бриллер Г.Е., Романова Т.П. и др. Половые различия в степени активации перекисного окисления липидов и устойчивости к кардиоваскулярным повреждениям у крыс при стрессе // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1995. Т. 119. № 4. С. 354-357.
6. Арбузов А.Е. Избранные труды по химии фосфорорганических соединений. М.: Наука, 1976. 560 с.
7. Ардаматский Н.А., Абакумова Ю. Показатели инфекционного процесса при атеросклерозе // Российский кардиологический журнал. 1998. № 6. С. 3-9.
8. Ардаматский Н.А., Абакумова Ю.В., Корсунова Е.Н. Методика определения физиологического и патологического перекисного окисления // Экоген. 1994. № 4. С. 9.
9. Ашихмина Т.Я. Комплексный экологический мониторинг объектов хранения и уничтожения химического оружия. Киров: Вятка, 2002. 544 с.
10. Бабаскин Б.С. Определение пировиноградной кислоты модифицированным методом Умбрайта // Лабораторное дело. 1976. № 3. С. 76.
11. Бадюгин Н.С., Хамитова Р.Я., Макаров Н.Я. Неспецифические механизмы действия антихолинэстеразных ФОС // Военно-медицинский журнал. 1979. № 4. С. 47-49.
12. Балеста П.С., Промоненков В.К., Мاستрюкова Т.А. Гербицидные свойства фосфорсодержащих аминокислот. Черкассы, 1987. 45 с.
13. Барабой В. А. Перекисное окисление и стресс. СПб.: Наука, 1992. 148 с.
14. Бекман Э. М., Баранова О.А., Губарева Е.В. и др. Оценка устойчивости к оксидативному стрессу плазмы крови по уровню окисляемости белков и липидов при металлкатализируемом окислении // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2006. Т. 142. № 3. С. 268-272.
15. Белецкая И.П., Новиков С.С. Химическое оружие в России // Вестник Российской академии наук. 1995. Т. 65. № 2. С. 99-111.
16. Белоногов Р. Н., Титова Н. М. Изменение содержания карбонильных производных белков у больных раком легкого // Сибирский онкологический журнал. 2007. № 2. С. 20-21.

17. Бересткин А.П. О роли гидрофобного взаимодействия в ингибировании холинэстераз // Химия и применение фосфорорганических соединений. М.: Наука, 1973. С. 322-323.
18. Бересткин А.П., Годовиков Н.Н. Комбинированный вид ингибирования холинэстераз фосфорорганическими соединениями // Успехи химии. 1978. Т. 47. № 9. С. 1609-1627.
19. Биохимия / Под ред. С. Е. Северина. М.: ГЕОТАР-МЕД, 2004. 784 с.
20. Бобкова Р.Г., Михалкина М.И., Швецов-Шиловский Н.И. Фосфонометилглицин и некоторые его производные. Черкассы, 1986. 40 с.
21. Болдырев А.А. Окислительный стресс и мозг // Соросовский образовательный журнал. 2001. № 4. С. 21-28.
22. Буканова Ю.В., Солнцева Е.И. Влияние хлорофоса на высокопороговые калиевые и кальциевые каналы нейрональной мембраны // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1996. Т. 121. № 1. С. 59-62.
23. Бурлакова Е.Б. Особенности действия сверхмалых доз биологически активных веществ и физических факторов низкой интенсивности // Российский химический журнал. 1999. Т. XLIII. Вып. 5. С. 3-11.
24. Бурлакова Е.Б., Конрадов А.А., Мальцева Е.Л. Действие сверхмалых доз биологически активных веществ и низкоинтенсивных факторов // Механизмы действия сверхмалых доз: Материалы IV Международного симпозиума. М., 2008. С. 390-424.
25. Бышевский А.Ш., Терсенов О.А. Биохимия для врача. Екатеринбург: Уральский рабочий, 1994. 384 с.
26. Вайдо А.И., Флеров М.А., Герасимова И.А. и др. Различия в процессах перекисного окисления белков у беременных крыс, селективных по порогу возбудимости нервной системы // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2002. Т. 133. № 3. С. 292-296.
27. Ван Везер Дж. Фосфор и его соединения. М.: ИЛ, 1962. 688 с.
28. Векслер Б.М. Характеристика системы перекисного окисления липидов крови в семьях больных ишемической болезнью сердца: Дис. ... канд. биол. наук. СПб., 1995. 76 с.
29. Вельтищев Ю.Е., Юрьева Э.А., Кудрин А.Н. Биологически активные фосфонные кислоты и их производные // Химико-фармацевтический журнал. 1983. Т. 18. № 3. С. 282-290.
30. Вилкинсон Д. Принципы и методы диагностической энзимологии. М.: Медицина, 1981. 624 с.
31. Владимиров Ю.А. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М.: Медицина, 1972. 252 с.
32. Владимиров Ю.А. Свободно-радикальное окисление липидов и физические свойства липидного бислоя биологических мембран // Биофизика. 1987. № 5. С. 830-834.

33. Владимиров Ю.А. Свободные радикалы и антиоксиданты // Вестник РАМН. 1998. № 7. С.43-51.
34. Владимиров Ю.А., Азизова О.А., Деев А.И. Свободные радикалы в живых системах // Итоги науки и техники. Серия «Биофизика». М.: ВИНТИ, 1991. Т. 29. С. 250.
35. Владыка А.С., Левицкий Э., Поддубная Л.П. Средние молекулы и проблема эндогенной интоксикации при критических состояниях различной этиологии // Анестезиология и реаниматология. 1987. № 2. С. 37-41.
36. Волков Н.И., Несен Э.Н., Осипенко А.А. и др. Биохимия мышечной деятельности. М.: Олимпийская литература, 2000. 503 с.
37. Вьюшина А.В., Вайдо А.И., Герасимова И.А. Процессы перекисного окисления белков у крыс, селективных по порогу возбудимости нервной системы // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2002. Т. 133. № 3. С. 292–296.
38. Вьюшина А.В., Герасимова И.Г., Флеров М.А. Перекисное окисление белков в сыворотке крови у пренатально стрессированных крыс // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2004. Т. 138. № 7. С. 41-44.
39. Вьюшина А.В., Герасимова И.Г., Флеров М.А. Перекисное окисление белков сыворотки крови у крыс, селектированных по скорости выработки условного рефлекса активного избегания, в норме и при стрессе // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2002. Т. 133. № 3. С. 286-291.
40. Вяселева С.М., Игнатьева О.А., Заиконникова И.В. Антибактериальные свойства органических соединений фосфора // Химия и применение фосфорорганических соединений: Труды II Всесоюзной конференции. М., 1962. С. 532-539.
41. Габриэлян Н.И., Дмитриев А.А., Кулаков Г.П. Диагностическая ценность определения средних молекул в плазме крови при нефрологических заболеваниях // Клиническая медицина. 1981. Т. LIX. № 10. С. 38-42.
42. Гаврилов В.Б., Бидула М.М., Фурманчук Д.А. Оценка интоксикации организма по нарушению баланса между накоплением и связыванием токсинов в плазме крови // Клиническая лабораторная диагностика. 1999. № 2. С. 13-17.
43. Гайдышев И.П. Анализ и обработка данных: Специальный справочник. СПб.: Питер, 2001. 750 с.
44. Галактионов С. Г., Николайчик В.В., Цейтин В.М. и др. Средние молекулы - эндотоксины пептидной природы // Химико-фармацевтический журнал. 1983. № 11. С. 1286-1288.
45. Гараев Р.С. Изыскание новых лекарственных средств в рядах фосфорорганических соединений // Казанский медицинский журнал. 2008. Т. LXXXIX. № 5. С. 585-598.
46. Гараев Р.С., Залялютдинова Л.Н., Гильмутдинова В.Р и др. Глицифон – лекарственное средство для лечения рака и предраковых заболеваний кожи // Ка-

- занский мед. журнал 2004. Т. LXXXV. № 6. С. 401-405.
47. Гитлина А.Г., Брюховец Т.Г. Метаболические аспекты действия на организм индустриальных химических соединений. Красноярск: АН СССР, 1988. С 14-19.
 48. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика, 1998. 459 с.
 49. Годовиков Н.Н. Антихолинэстеразные свойства некоторых фосфорорганических соединений // Химия и применение фосфорорганических соединений. М.: Наука, 1972. С. 423-431.
 50. Голиков С.Н., Кузнецов С.Г. Современные представления о природе холинорецептора // Вестник АМН СССР. 1970. № 2. С. 67-85.
 51. Голиков С.Н., Розенгарт В.И. Фармакология и токсикология фосфорорганических соединений. Л.: Медгиз, 1960. 111 с.
 52. Голиков С.Н., Розенгарт В.И. Холинэстеразы и холинэстеразные вещества. Л.: Медицина, 1964. С. 140.
 53. Голиков С.Н., Саноцкий И.В., Тиунов Л.А. Общие механизмы токсического действия. Л.: Медицина, 1986. 279 с.
 54. Готовский Ю.В., Перов Ю.Ф. Особенности биологического действия физических факторов малых и сверхмалых интенсивностей и доз. М.: Имедис, 2000. 192 с.
 55. Грабар П., Буртен П. Иммуноэлектрофоретический анализ. М.: Ин. лит., 1963. 206 с.
 56. Граник В.Г. Метаболизм эндогенных соединений. М.: Вузовская книга, 2006. 528 с.
 57. Граник В.Г. Токсикология лекарств. М.: Вузовская книга, 2009. 440 с.
 58. Грапов А.Ф., Мельников Н.Н. Синтез и гербицидная активность амидов фосфоновых и тиофосфоновых кислот // Химия и применение фосфорорганических соединений: Труды IV Всесоюзной конференции. М.: Наука, 1972. С. 379-385.
 59. Грапов А.Ф., Мельников Н.Н. Фосфорорганические фунгициды. М.: НИИТЭ-Хим, 1972. 46 с.
 60. Гублер Е.В., Генкин А.А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. Л.: Медицина, 1973. 141 с.
 61. Губский Ю.И., Беленичев И.Ф., Левицкий Е.Л. и др. Токсикологические последствия окислительной модификации белков при различных патологических состояниях (обзор литературы) // Современные проблемы токсикологии. 2005. №3. С. 20-26.
 62. Губский Ю.И., Беленичев И.Ф., Павлов С.В. и др. Токсикологические последствия окислительной модификации белков при различных патологических состояниях // Современные проблемы токсикологии. 2005. № 3. С. 20-26.
 63. Гудим В.И., Сигалла П.И. Клиническое значение средних молекул в патогенезе нефрогенной анемии // Терапевтический архив. 1983. № 6. С.78-82.

64. Гуляева Л.Ф., Вавилин В.А., Ляхович В.В. Ферменты биотрансформации ксенобиотиков в химическом канцерогенезе: аналитический обзор. Новосибирск: ГПНТБ, 2000. 90 с.
65. Гуляева Л.Ф., Гришанова А.Ю., Громова О.А. и др. Микросомная монооксигеназная система живых организмов в биомониторинге окружающей среды: аналитический обзор. Новосибирск: ГПНТБ, 1994. 98с.
66. Давыдов В. В. Особенности свободнорадикальных процессов в печени взрослых и старых крыс при стрессе // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2004. Т. 137. № 2. С. 160-163.
67. Данилов А.Ф., Рожкова Е.К. О трех механизмах блокирующего действия фосфорорганических антихолоинэстеразных веществ на нервно-мышечное проведение // Гигиена и токсикология пестицидов и клиника отравлений. Киев: Здоров'я, 1965. С. 284-291.
68. Доутерман У. Биологические и небιологические превращения фосфорорганических соединений // Бюллетень ВОЗ. 1972. Т. 44. № 1. С. 135-152.
69. Дрожко Д.Е. Поведение актинидов и осколочных элементов в экстракционных системах с моно- и бидентатными фосфорорганическими соединениями в процессе фракционирования высокоактивных отходов: Автореф. дис....канд. хим. наук. М., 2007. 22 с.
70. Дубинина Е.Е. Антиоксидантная система плазмы крови // Украинский биохимический журнал. 1992. Т. 64. № 2. С. 3-14.
71. Дубинина Е.Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток (жизнь и смерть, созидание и разрушение). Физиологические и клинико-биохимические аспекты. СПб.: Мед. Пресса, 2006. 397 с.
72. Дубинина Е.Е. Роль активных форм кислорода в качестве сигнальных молекул в метаболизме тканей при состояниях окислительного стресса // Вопросы медицинской химии. 2001. № 6. С. 561-581.
73. Дубинина Е.Е., Шугалей И.В. Окислительная модификация белков // Успехи современной биологии. 1993. № 1. С. 71-79.
74. Дятлова Н.М., Дытюк Л.Т., Самакаева Р.Х. Применение комплексонов в нефтедобывающей промышленности. М.: НИИТЭХим, 1983. 47с.
75. Евдокушкин А. Военные ученые рассмотрели актуальные вопросы процесса уничтожения химического оружия в России // Российская газета. Федеральный выпуск. 2010. 24 окт. (№5344 (265)).
76. Ершова Е.А., Жминько П.Г. Роль монооксидазной гидроксилирующей системы печени в тион-тиольной изомеризации циклофоса // Химия физиологически активных соединений: Тезисы докладов Всесоюзного семинара. Черноголовка, 1989. С. 96.
77. Ефременко Е.Н., Варфоломеев С.Д. Ферменты деструкции фосфорорганических нейротоксинов // Успехи биологической химии. 2004. Т. 44. С. 307-340.

78. Ефременко Е.Н., Вотчицева Ю.А., Курочкин И.Н. Способ ферментативного гидролиза броевых отравляющих веществ. Патент РФ № 2296164. 27.03.2007. Бюллетень № 9.
79. Ефременко Е.Н., Завьялова Н.В., Гудков Д.А. Экологически безопасная биодеградация реакционных масс, образующихся при уничтожении фосфорорганических отравляющих веществ // Российский химический журнал. 2010. Т. LIV. № 4. С. 19-24.
80. Ефременко Е.Н., Сергеева В.С. Органофосфатгидролаза – фермент, катализирующий деградацию фосфорсодержащих отравляющих веществ и пестицидов // Известия АН. Серия «Химия». 2001. № 10. С. 1743-1749.
81. Забродский П.Ф. Механизмы иммунотропных эффектов фосфорорганических соединений // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1993. Т. 116. № 8. С. 181-183.
82. Забродский П.Ф. Киричук В.Ф., Гермачук В.Г. Роль антихолинэстеразного механизма в супрессии антителиобразования при острой интоксикации фосфорорганическими соединениями // Фармакология и токсикология. 2001. Т. 131. № 5. С. 551-553.
83. Заиконникова И.В., Студенцова И.А., Гараев Р.С. Химическая структура, токсичность и антихолинэстеразная активность нитрофенольных эфиров диалкилфосфиновых кислот и их циклических аналогов // Фармакология и токсикология ФОС и других биологически активных веществ. Казань, 1969. С. 47-49.
84. Зайчик А.Ш., Чурилов Л.П. Основы патохимии. СПб.: ЭЛБИ, 2001. 688 с.
85. Западнюк И.П., Западнюк В.И., Захария Е.А. и др. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте. Киев, 1983. 383 с.
86. Заугольников С.Д. Материалы к токсикологии фосфорорганических соединений // Химия и применение фосфорорганических соединений: Труды II Всесоюзной конференции, Казань, 1959. М.: Изд-во АН СССР, 1962. С.480-484.
87. Заугольников С.Д., Кочанов М.М., Лойт А.О. и др. Экспрессные методы определения токсичности и опасности химических веществ. М.: Медицина, 1978. 184с.
88. Защита от оружия массового поражения / Под ред. В.В. Мясникова. М.: Воениздат, 1989. 399 с.
89. Зборовская И.А. Банникова М.В. Антиоксидантная система организма, ее значение в метаболизме. Клинические аспекты // Вестник РАМН.1995. № 6. С. 53-60.
90. Зеймаль Э.В., Михельсон М.Я., Рыболовлев Р.С. Связь между химическим строением и фармакологическим действием некоторых холинолитических, холиномиметических и антихолинэстеразных веществ // Физиологическая роль ацетилхолина и изыскание новых лекарственных веществ. Л., 1957. С. 424-441.

91. Зеймаль Э.В., Михельсон М.Я., Фруентов Н.К. О физиологической активности фосфорорганических соединений // Химия и применение фосфорорганических соединений: Сб. трудов II Всесоюзной конференции. Казань, 1959 г. М.: Изд-во АН СССР, 1962. С. 403-423.
92. Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньщикова Е.Б. Окислительный стресс. Биохимический и патофизиологический аспекты. М.: МАИК Наука / Интерпериодика, 2001. 343 с.
93. Зенков Н.К., Меньщикова Е.Б. Активированные кислородные метаболиты в биологических системах // Успехи современной биологии. 1993. № 3. С. 286-296.
94. Зенков Н.К., Меньщикова Е.Б., Шергин С.М. Окислительный стресс. Диагностика, терапия, профилактика. Новосибирск: РАМН, 1993. 181 с.
95. Зилва Дж.Ф., Пеннел П.Р. Клиническая химия в диагностике и лечении. М.: Медицина, 1988. 528 с.
96. Зильбер В. Роман о гомеопатии // Наука и жизнь. 2000. № 3. С. 72-78; № 5. С. 114-120; № 12. С. 89-96.
97. Итоги работы объекта по уничтожению химического оружия «Щучье» в 2010 году и планы на 2011 год // Открытый электронный журнал «Химическое разоружение» // <http://chemdisarm.ru/articles/4348>.
98. Кабачник М.И. Влияние фосфорорганических веществ на передачу нервно-мышечного возбуждения // Вестник АН СССР. 1968. № 5. С. 86-94.
99. Кабачник М.И., Абдувахабов А.А., Агабекова И.Н. и др. Гидрофобные области активной поверхности холинэстераз // Успехи химии. 1970. Т.39. № 6. С. 1050-1073.
100. Кабачник М.И., Мاستрюкова Т.А., Шостаковский М.Ф. Некоторые вопросы строения и реакционной способности фосфорорганических соединений // Химия и применение фосфорорганических соединений. М.: Наука, 1962. С. 24-45.
101. Кабачник М.И., Медведь Т.Я., Дятлова Н.М. и др. Фосфорорганические вещества. М.: Знание, 1967. 32 с.
102. Кабачник М.И., Медведь Т.Я., Дятлова Н.М. и др. Фосфорорганические комплексоны // Успехи химии. 1974. Т. 43. № 9. С. 1554-1574.
103. Каган Ю.С. Токсикология фосфорорганических инсектицидов и гигиена труда при их применении. М.: Изд-во медицинской литературы, 1963. 326 с.
104. Каган Ю.С. Токсикология фосфорорганических пестицидов // Гигиена применения пестицидов: Сб. учебно-метод. материалов / Под ред. Ю.И. Кундиева. М.: Центр международных проектов Госкомприроды СССР, 1991. С. 153-167.
105. Каган Ю.С. Токсикология фосфорорганических пестицидов. М.: Медицина, 1977. 293 с.
106. Каган Ю.С., Ершова Е.А., Леоненко О.Б. и др. Роль монооксидазной системы в метаболизме и механизме действия некоторых пестицидов // Вестник АМН СССР. 1988. № 1. С. 70-76.

107. Каган Ю.С., Клисенко М.А., Паньшина Т.Н. Некоторые вопросы количественной токсикологии фосфорорганических соединений // Химия и применение фосфорорганических соединений: Труды III Всесоюзной конференции. М.: Наука, 1972. С. 438-447.
108. Каган Ю.С., Кошкарёва Н.В., Ткаченко И.И. О ранних проявлениях и механизме нейротоксического действия фосфорорганических пестицидов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1986. № 9. С. 310-312.
109. Казначеева В.П. Современные аспекты адаптации. Новосибирск: Наука, 1980. 190 с.
110. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике. М.: МЕДпресс-информ, 2004. 920 с.
111. Карякина Е.В., Белова С.В. Молекулы средней массы как интегральный показатель метаболических нарушений (обзор литературы) // Клиническая лабораторная диагностика. 2004. № 3. С. 3-7.
112. Кибри А., Уоррен С. Органическая химия фосфора. М.: Мир, 1971. 403 с.
113. Кислый Н.Д., Самгина Т.С., Макаров Н.Н. Динамика факторов неспецифической резистентности у больных хроническим алкоголизмом // Вестник РУДН. Сер. «Терапия». 1999. № 1. С. 52-54.
114. Клебанов Г.И., Теселкин Ю.О., Бабенкова И.В. и др. Антиоксидантная активность сыворотки крови // Вестник Российской академии медицинских наук. 1999. № 2. С. 15-22.
115. Клещенко Е. Снова о сверхмалых дозах // Химия и жизнь. 2000. № 11/12. С. 31-33.
116. Климов А.Н., Никульчева Н.Г. Обмен липидов и липопротеидов и его нарушения. СПб.: Питер, 1999. 512 с.
117. Клиническая оценка лабораторных тестов / Под ред. Н.У. Тица. М.: Медицина, 1986. 480 с.
118. Ковалевский А. Н., Нифантьев О. Е. Замечания по скрининговому методу определения молекул средней массы // Лабораторное дело. 1989. № 10. С. 35-39.
119. Козак М.В. Половые различия уровня перекисного окисления липидов белых крыс в норме и его изменения после гонадэктомии и введения α -токоферола // Вопросы медицинской химии. М.: Периодика, 2000. № 6. С. 115-118.
120. Комаров Ф.И., Коровкин Б.Ф., Меньшиков В.В. Биохимические исследования в клинике. М: Элиста АПП Джангар, 2001. 216 с.
121. Конвенция о запрещении разработки, производства, накопления и применения химического оружия и о его уничтожении. GE. 92-61926. Париж, 1993. 133 с.
122. Кононова С.В., Несмеянова М.А. Фосфонаты и их деградация микроорганизмами // Биохимия. 2002. Т. 67. № 2. С. 220-233.

123. Копытова Т.В., Дмитриева О.Н., Химкина Л.Н. и др. Окислительная модификация белков и олигопептидов у больных хроническими дерматозами с синдромом эндогенной интоксикации // *Фундаментальные исследования*. 2009. № 6. С. 25-29.
124. Копытова Т.В., Добротина Н.А., Химкина Л.Н. и др. Лабораторная диагностика эндоинтоксикации при хронических дерматозах // *Клиническая лабораторная диагностика*. 2000. № 1. С. 14-16.
125. Корепин А.М., Плотникова О.М. Динамика содержания маркеров эндогенной интоксикации в крови при воздействии метилфосфонатов на лабораторных мышей // *Экологически безопасные и ресурсосберегающие технологии и материалы: Материалы региональной научно-практической конференции с международным участием*. Улан-Удэ, 2010. С. 91-93.
126. Коржеев А.А., Комисарова И.А. О механизме повреждающего действия гипоксии на дыхательную цепь и способы ее фармакологической коррекции // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 1994. Т. 57. № 1. С. 45-47.
127. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г. и др. Метод определения активности каталазы // *Лабораторное дело*. 1988. № 1. С. 16-19.
128. Кравцов И.С., Янов С.Н., Дармов И.В. и др. Выделение из окружающей среды микроорганизмов, способных разлагать фосфонаты // *Журнал химическая и биологическая безопасность*. 2006. № 6 (30). С. 3-9.
129. Красовский Г.Н. Возрастная, половая и видовая чувствительность к химическим веществам // *Профилактическая токсикология: Сб. учебно-метод. материалов*. М.: МРПТХВ, 1984. Т. 1. С. 268-281.
130. Курляндский Б.А. О некоторых закономерностях развития хронических интоксикаций промышленными органическими веществами (к проблеме токсических воздействий малой интенсивности): Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. М., 1970. 48 с.
131. Курочкин В.К., Лошадкин Н.А., Попов А.Г. и др. Классификация информации по химическим веществам и военной токсикологии в контексте проблем химического разоружения // *Токсикологический вестник*. 1994. № 3. С. 19-23.
132. Кухарь В.П., Солоденко В.А. Фосфорные аналоги аминокислот // *Успехи химии*. 1987. Т. 56. № 9. С. 1504-1532.
133. Куценко С.А. Военная токсикология, радиобиология и медицинская защита. СПб.: Изд-во «Фолиант», 2004. 628 с.
134. Куценко С.А. Основы токсикологии. СПб.: Изд-во «Фолиант», 2004. 720 с.
135. Лабораторная диагностика нарушений обмена белков / Под ред. В.В.Долгова, О.П. Шевченко. М.: РМАПО, 1997. 67 с.
136. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / Под ред. В.В. Миньшикова. М.: Медицина, 1987. 368 с.
137. Лебедева Н.Е., Головкина Т.В., Горбатова Е.Н. и др. Эффекты фентанила в

- сверхмалых дозах // Химическая и биологическая безопасность. М.: ВНИИ-ТИ. 2003. № 9-10. С. 7-8.
138. Лебкова Н.П. Современные представления о внутриклеточных механизмах обеспечения энергетического гомеостаза в норме и патологии // Вестник РАМН. 2000. № 9. С. 16-22.
139. Левин Я.А., Воркунова Е.И. Гомолитическая химия фосфора. М.: Наука, 1978. 320 с.
140. Лошадкин Н.А. Некоторые вопросы биохимического механизма и токсического действия фосфорорганических ингибиторов холинэстераз // Сондарс Б. Химия и токсикология органических соединений фосфора и фтора. М.: Мир, 1961. С. 315-418.
141. Лошадкин Н.А., Абнизов С.С. Классификация токсичных веществ, вызывающих различные типы гипоксий на начальных стадиях интоксикации // Токсикологический вестник. 1995. № 3. С. 25-27.
142. Лужников Е.А. Клиническая токсикология. М.: Медицина, 1982. 368 с.
143. Маковская Е.И. Морфологические изменения в организме животных при отравлении фосфорорганическими инсектицидами // Химия и применение фосфорорганических соединений: Труды II Всесоюзной конференции. Казань, 1959. М.: АН СССР, 1962. С. 485-489.
144. Малахова М.Я. Методы биохимической регистрации эндогенной интоксикации. Сообщение второе // Эфферентная терапия. 1995. Т. 1. № 2. С. 61-64.
145. Малахова М.Я. Формирование биохимического понятия «субстрат эндогенной интоксикации» // Эндогенные интоксикации: Тезисы международного симпозиума 14-16 июня 1994 г. СПб., 1994. С. 38.
146. Малахова М.Я. Эндогенная интоксикация как отражение компенсаторной перестройки обменных процессов в организме // Эфферентная терапия. 2000. Т. 6. № 4. С. 3-14.
147. Малахова М.Я., Зубаткина О.В., Совершаева С.Л. Оценка эндогенной интоксикации у населения, проживающего в различных экологических условиях севера и северо-запада России // Эфферентная терапия. 1998. Т.4. № 2. С. 50-55.
148. Малахова М.Я., Соломеников А.В., Беляков Н.А. и др. Определение фракции молекул средней массы в сыворотке крови осаждением белков ТХУ и ультрафильтрацией // Лабораторное дело. 1987. №3. С. 224-227.
149. Мари Р., Греннер Д., Мейес П. и др. Биохимия человека: В 2 т. М.: Мир, 2004.
150. Матвеев Н.Н., Плотникова О.М. Влияние введения метилфосфоновой кислоты в дозах 2 и $1 \cdot 10^{-15}$ мг/кг на показатели перекисного окисления липидов и антиоксидантную систему лабораторных мышей // Биология будущего: традиции и инновации: Материалы Всероссийской молодежной научной конференции. Екатеринбург, 2010. С. 137-138.

151. Матвеев С.Б., Спиридонова Т.Г., Клычникова Е.В. и др. Критерии оценки эндогенной интоксикации при ожоговой травме // Клиническая лабораторная диагностика. 2003. № 10. С. 3-6.
152. Матье С.В., Лауринавичус К.С., Несмеянова М.А. Разложение метилфосфоновой кислоты и его физиологическая регуляция у *Escherichia coli*. // Микробиология. 1996. № 4. С. 481-487.
153. Машковский М.Д. Лекарственные средства. М.: Новая волна, 2006. 1206 с.
154. Медицинская биохимия: Лабораторный практикум / Под ред. Н. А. Семиколововой. Омск: Изд-во ОмГУ, 2005. 76 с.
155. Меерсон Ф. З., Малышев И. Ю., Замотринский А. В. Генерализованное накопление стресс-белков при адаптации организма к стрессорным воздействиям // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1993. Т. 116. № 10. С. 231-233.
156. Международные рекомендации по проведению медико-биологических исследований с использованием животных // Ланималогия. 1993. № 1. С. 29.
157. Международный регистр потенциально токсичных химических веществ. Международные карты химической безопасности: ICSC // Институт промышленной безопасности, охраны труда и социального партнерства. <http://www.safework.ru/ilo/ICSC/>
158. Мельников Н.Н. Пестициды. Химия, технология и применение. М.: Химия, 1987. 711 с.
159. Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К. Антиоксиданты и ингибиторы радикальных окислительных процессов // Успехи современной биологии. 1993. № 4. С. 442-455.
160. Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К., Шергин С.М. Биохимия окислительного стресса. Оксиданты и антиоксиданты. Новосибирск, 1994. 203 с.
161. Метлушкина К.Е., Желтухин В.Ф., Садкова Д.Н. и др. Новый хиральный индуктор в синтезе α -аминофосфонатов // Материалы докладов XI школы-конференции по органической химии. Екатеринбург, 2008. С. 146-148.
162. Милаева Е.Р., Тюрин В.Ю., Харитонашвили Е.В. и др. Молекулярные механизмы действия ртутьорганических соединений на электрон-транспортную цепь митохондрий // Материалы XVI Менделеевского съезда по общей и прикладной химии. СПб., 1998. С. 102.
163. Митрохин Н.М., Жигачева И.В., Чаморовская Л.Т. и др. Влияние комбинированного действия солей металлов и фенола на энергетiku изолированных митохондрий печени крыс // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1992. № 1. С. 47-50.
164. Михайлов С.С., Щербак И.Г. Метаболизм фосфорорганических ядов. М.: Медицина, 1983. 112 с.

165. Михельсон М.Я., Зеймаль Э.В. Ацетилхолин. Л.: Наука, 1970. С. 28.
166. Мусийчук Ю.И. Медико-гигиенические аспекты уничтожения фосфорорганических (нервно-паралитических) отравляющих веществ / // Медико-экологическая безопасность в регионах хранения и уничтожения химического оружия. М.-СПб., 1998. Вып. 3. 62 с.
167. Назаренко Г. И., Кишкун А. А. Клиническая оценка результатов лабораторных исследований. М.: Медицина, 2006. 544 с.
168. Николаев А.А, Поршнева Д.В., Меснянкин А.П. и др. Средние молекулы и их фракции при астраханской риккетсиозной лихорадке // Клиническая лабораторная диагностика. 1999. №6. С. 41-42.
169. Нифантьев Э. Е. Химия гидрофосфорильных соединений. М.: Наука, 1983. 263 с.
170. Нифантьев Э.Е. Фосфорорганические соединения // Соросовский образовательный журнал. 1996. № 7. С. 39-46.
171. Нифантьев Э.Е. Химия фосфорорганических соединений. М.: Изд-во МГУ, 1971. 352 с.
172. Нифантьев Э.Е., Кухарева Т.С. Обзор монографий и обзоров по химии фосфорорганических соединений. М.: Наука, 1989. 160 с.
173. Ноздрачев А.Д., Жекалов А.Н., Коваленко Р.И. Динамика перекисного окисления липидов при адаптации человека к новым экологическим условиям // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1997. Т. 134. № 12. С. 678-682.
174. Нормативные данные по предельно допустимым уровням загрязнения вредными веществами объектов окружающей среды. СПб.: НТЦ «Амекос», 1994.
175. О'Брайн Р. Токсические эфиры кислот фосфора. М.: Мир, 1964. 631 с.
176. Общая токсикология / Под ред. Б.А. Курляндского, В.А. Филова. М.: Медицина, 2002. 608 с.
177. Огородникова С.Ю., Головкин Т.К., Ашихмина Т.Я. Реакции растений на фосфорорганический ксенобиотик – метилфосфоновою кислоту // Научные доклады. Сыктывкар: Коми НЦ УрО РАН, 2004. Вып. 464. 24 с.
178. Огородникова С.Ю., Головкин Т.К., Ашихмина Т.Я. Реакция растений на действие метилфосфоновой кислоты // Теоретическая и прикладная экология. 2007. № 1. С. 78-93.
179. Одинцов В.С. Биохимические основы применения фосфорорганических инсектицидов. Киев: Наукова думка, 1972. 175 с.
180. Олдридж В. Механизм взаимодействия фосфорорганических соединений и карбаматов с эстеразами // Бюллетень ВОЗ. 1972. Т. 44. № 1/3. С. 27-33.
181. Оразаев Н.Г. Методы оценки эндогенной интоксикации при гриппе. Нальчик: Изд-во Кабардино-Балкарского гос. ун-та, 2007. 98 с.
182. Осипова В.П., Пименов Ю.Т., Берберова Н.Т. и др. Ингибирующее действие ртутьорганических соединений на процессы клеточного и митохондриального

- дыхания // Токсикологический вестник. 1999. № 1. С. 21-26.
183. Осипович В. К., Туликова З. А., Маркелов И. М. Сравнительная оценка экспресс - методов определения средних молекул // Лабораторное дело. 1987. № 3. С. 221-224.
184. Остерман Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: электрофорез и ультрацентрифугирование. М.: Наука, 1981. 288 с.
185. Панасенко О.М., Сергиенко В.И. Гипохлорит, окислительная модификация липопротеинов крови и атеросклероз // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2001. Т. 131. № 5. С. 484-493.
186. Панин Л.Е. Биохимические механизмы стресса. Новосибирск: Наука, 1983. 232 с.
187. Панин Л.Е. Некоторые биохимические аспекты проблемы адаптации // Медикобиологические аспекты адаптации. Новосибирск: Наука, 1975. 296с.
188. Парфенкова Г.А., Чернядьева И.Ф., Ситина В.К. Средние молекулы - маркер эндогенной интоксикации // Врачебное дело. 1987. №4. С. 72-77.
189. Патологическая физиология / Под. ред. А.Д. Адо и Л.М. Ишимовой. М.: Медицина, 1980. 520 с.
190. Пеньковский В.В. Свободные радикалы соединений фосфора // Успехи химии. 1975. Т. 44. № 6. С. 969-1002.
191. Перечень предельно допустимых концентраций и ориентировочно безопасных уровней воздействия вредных веществ для воды рыбохозяйственных водоемов / Под ред. М.Л. Кашинцева. М.: Колос, 1993.
192. Петров К.А., Баскова Р.А., Хорхояну Л.В. и др. Свойства ангидридов фосфиновых кислот. I. Моноалкил(арил)фосфонаты // Журнал общей химии. 1963. Т. 35. № 4. С. 723-728.
193. Петров К.А., Чаузов В.Л., Ерохина Т.С. Аминоалкильные фосфорорганические соединения // Успехи химии. 1974. Т. 43. № 11. С. 2045-2087.
194. Плотникова О.М., Дуплякина И.В., Корепин А.М. Биохимическая оценка активности антиоксидантной системы овса при воздействии фосфорсодержащих поллютантов. // Вестник Курганского университета. Серия «Естественные науки». Вып. 2. Курган: Изд-во КГУ, 2009. С. 71-74.
195. Плотникова О.М., Корепин А.М., Матвеев Н.Н. и др. К вопросу возможного влияния на мелких грызунов метилфосфонатов – особой группы веществ антропогенной природы // Антропогенная трансформация природной среды: Материалы международной конференции. Пермь, 2010. С. 133-140.
196. Плотникова О.М., Корепин А.М., Матвеев Н.Н. и др. Свободнорадикальное окисление белков и липидов и энергетический обмен у лабораторных мышей при воздействии метилфосфонатов как специфических поллютантов // Бюллетень МОИП. Отдел биологический. М., 2009. Т. 114. Вып. 3. Прил. 1. Ч. 3. С. 162-165.

197. Плотникова О.М., Матвеев Н.Н. Биохимические показатели в оценке качества окружающей среды // Химия и общество. Грани взаимодействия: вчера, сегодня, завтра: Материалы юбилейной научной конференции, посвященной 80-летию химфака МГУ. М.: МГУ, 2009. С. 102.
198. Плотникова О.М., Матвеев Н.Н., Дуплякина Н.Н. и др. Оценка экотоксичности специфических загрязняющих веществ по изменению биохимических показателей живых организмов // Теоретическая и прикладная экология. 2008. № 4. С. 42-47.
199. Плотникова О.М., Матвеев Н.Н., Корепин А.М. и др. Биохимические показатели лабораторных мышей в зависимости от времени интоксикации метилфосфонатом // Теоретическая и прикладная экология. 2010. № 1. С. 81-86.
200. Плотникова О.М., Матвеев Н.Н., Савинова И.В. и др. Оценка влияния низких доз метилфосфоната на теплокровных животных по биохимическим показателям крови мышей // Естественные и технические науки. М.: Изд-во Спутник+, 2011. № 1. С. 32-37.
201. Поляк М.С. Антибиотики группы фосфоновой кислоты // Антибиотики. 1987. Т. 32. № 1. С. 66-75.
202. Правдин Н.С. Методика малой токсикологии промышленных ядов. М.: Медгиз, 1947. 219 с.
203. Правдин Н.С. Руководство промышленной токсикологии. Вып.1: Общая часть. Яды основной химической промышленности. М.-Л.: Биомедгиз, 1934. 259 с.
204. Правила лабораторной практики в Российской Федерации: приложение к приказу МЗ РФ № 267 от 19.06.2003.
205. Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных: приложение к приказу Министерства здравоохранения СССР № 755 от 12.03.1977 г.
206. Практикум по биохимии / Под ред. С.Е. Северина, Г.А. Соловьевой. М.: Изд-во МГУ, 1989. 509 с.
207. Прозоровский В.Б., Ливанов Г.А. Некоторые теоретические и клинические проблемы токсикологии фосфорорганических инсектицидов // Токсикологический вестник. 1997. № 3. С. 2-10.
208. Прозоровский В.Б., Саватеев Н.В. Неантихолинэстеразные механизмы действия антихолинэстеразных веществ. М.: Медицина, 1976. 160 с.
209. Прозоровский В.Б., Скопичев В.Г., Панченкова О.А. Оценка реактиватора холинэстеразы карбоксима как средства профилактики отравлений фосфорорганическими ингибиторами холинэстераз // Психофармакология и биологическая наркология. 2008. Т. 8. Вып. 3-4. С. 2457-2462.
210. Промоненков В.К., Каспаров В.А., Варшавская И.С. Мировое производство и применение фосфорорганических пестицидов // Итоги науки и техники. Сер.

- Орг. химия. Т. 8. Актуальные направления исследования и применения химических средств защиты растений. Фосфорорганические соединения. М.: ВИНТИ, 1988. 203 с.
211. Пудовик А.Н., Ястребов Г.Е. Фосфорорганические соединения с активной метиленовой группой // Успехи химии. 1970. Т. 39. № 7. С. 1190-1219.
212. Пурдела Д., Вылчану Р. Химия органических соединений фосфора. М.: Химия, 1972. 752 с.
213. Райс Р.Х., Гуляева Л.Ф. Биологические эффекты токсических соединений. Новосибирск, 2003. 122 с.
214. Растегаев О.Ю., Чупис В.Н., Марьин В.И. и др. Фосфорорганические отравляющие вещества. Свойства и методы определения. Саратов: Фиеста-2000, 2009. 219 с.
215. Раундап - экологический пестицид массового поражения. Микробные биотехнологии ремедиации почв, загрязненных фосфорорганическими пестицидами // Интернет-журнал «Коммерческая Биотехнология» // <http://www.cbio.ru/modules/news/article.php?storyid=3381>. 12.07.2009.
216. Рожинская Л.Я. Постменопаузальный и сенильный остеопороз: современные возможности диагностики, профилактики и лечения // Consilium medicum. 2003. Т. 5. № 12. // <http://www.consilium-medicum.com>.
217. Розенгарт В.И. Метаболизм фосфорорганических соединений в организме животных // Химия и применение фосфорорганических соединений: Труды III Всесоюзной конференции. М.: Наука, 1972. С. 89-97.
218. Розенгарт В.И. Пути метаболических превращений фосфорорганических пестицидов // Химия в сельском хозяйстве. 1978. Т. 16. № 1. С. 54-64.
219. Розенгарт В.И. Холинэстеразы. Функциональная роль и клиническое значение // Проблемы медицинской химии. М.: Медицина, 1973. С. 66-106.
220. Розенгарт В.И., Шерстобитов О.Е. Избирательная токсичность фосфорорганических инсектоакарицидов (сравнительно-биохимические аспекты) / Под ред. А.П. Бресткина. Л.: Наука: Лен. отд., 1978. 176 с.
221. Ротенберг Ю.С. Классификация ксенобиотиков по локализации их действия на ферментные системы митохондрий // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1982. № 9. С. 42-45.
222. Ротенберг Ю.С. Проблема влияния промышленных токсических веществ на биоэнергетические процессы организма в гигиене и токсикологии: Дис. д-ра мед. наук. М., 1980.
223. Ротенберг Ю.С., Кельман Г.Я. Ингибирование процессов выхания и фосфорилирования производными малеимида // Биохимия. 1975. Т. 40. Вып. 3. С. 489-496.
224. Ротенберг Ю.С., Курляндский Б.А. О возможности расчета токсических и минимально действующих концентраций промышленных ядов в тканях по их

- ингибиторной активности // Гигиена труда и профессиональные заболевания. 1978. № 5. С. 38-41.
225. Ротенберг Ю.С., Мазаев В.Т., Шлепинина Т.Г. Особенности действия оловоалкилов на дыхание и окислительное фосфорилирование митохондрий печени крыс // Украинский биохимический журнал. 1978. Т. 50. № 6. С. 695-700.
226. Руководство по токсикологии отравляющих веществ / Под ред. С.Н.Голикова. М: Медицина, 1972. 470 с.
227. Рыболовлев Р.С. Роль эстератических участков холинорецепторов в блокирующем действии некоторых инсектицидов // В кн.: Гигиена и токсикология пестицидов и клиника отравлений. Киев: Здоров'я, 1965. С. 452-458.
228. Савельева Е.И., Зенкевич И.Г., Кузнецова Т.А. и др. Исследование продуктов превращений фосфорорганических отравляющих веществ методом газовой хроматографии-масс-спектрологии // Российский химический журнал (Журнал Российского химического общества им. Д.И. Менделеева). 2002. Т. XLVI. № 6. С. 83-91.
229. Савинова И.В., Плотникова О.М. Изменение некоторых показателей углеводного обмена лабораторных мышей в ответ на введение метилфосфоната // Антропогенная трансформация природной среды: Материалы международной конференции. Пермь, 2010. С. 141-142.
230. Савинова И.В., Плотникова О.М., Лунева С.Н. Изучение некоторых показателей углеводного обмена лабораторных мышей при интоксикации метилфосфонатом // Естественные и технические науки. М.: Изд-во Спутник+, 2011. № 1. С. 38-41.
231. Садыков А.С., Розенгарт Е.В., Абдувахабов А.А. и др. Холинэстеразы. Активный центр и механизм действия. Ташкент: Фан, 1976. 206 с.
232. Санитарные правила по определению класса опасности токсичных отходов производства и потребления. СП 2.1.7.2570-10.
233. Санитарные правила по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев): утв. 06.04.1973 № 1945-73.
234. Сборник инструктивно-методических документов по проблеме уничтожения химического оружия: В 2 ч. / Под ред. В.Д. Ревы. М.: Медбиоэкстрем, 2001.
235. Семина И.И., Байчурина А.З., Гараев Р.С. Особенности антидепрессивного эффекта О-β-хлорэтил-пара-N-диметиламинофенилфосфинилуксусной кислоты (Амфазида) // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1996. Т. 121. № 5. С. 538-540.
236. Сергеев П.В., Ухина Т.В., Шимановский Н.Л. Влияние половых стероидных гормонов на процессы перекисного окисления липидов и антиперекисную систему глутатиона в тканях кожи крыс // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1999. Т. 128. № 12. С. 663-666.

237. Серебрякова Н.Н. Влияние ксенобиотиков на физиологию и биохимию листостебельных мхов // Вестник Оренбургского гос. ун-та. 2007. № 12. С. 71-75.
238. Сидорин Г.И., Суворов И.М., Луковникова Л.В. и др. Нитрилы: токсикокинетика, токсичность и опасность // Токсикологический вестник. 1996. № 1. С. 19-22.
239. Сидоров П. И., Соловьев А. Г., Синицкая Е. Н. Эндотоксикоз при острых алкогольных психозах // Наркология. 2002. № 4. С. 16-21.
240. Современные методы в биохимии / Под ред. В.Н. Ореховича. М.: Медицина, 1977. 392 с.
241. Сокальский М.А., Сокальская Л.И., Татарников А.В. Утилизация отравляющих веществ и полупродуктов их синтеза: получение на их основе ионообменных материалов для гидрометаллургии // Российский химический журнал. 2001. Т. XLV. № 5-6. С. 157-162.
242. Сондерс Б. Химия и токсикология органических соединений фосфора и фтора. М.: Мир, 1961. 424 с.
243. Справочник по лабораторным методам исследования / Под ред. Л.А. Даниловой. СПб.: Питер, 2003. 733 с.
244. Строев Ю.И., Цой Л.П., Чурилов Л.П. и др. Классические и современные представления о метаболическом синдроме. Ч. 1. Критерии, эпидемиология, этиология // Вестник Санкт-Петербургского ун-та. 2007. Сер. 11. Вып. 1. С. 3–15.
245. Титов В. Н. Альбумин, транспорт насыщенных жирных кислот и метаболический стресс-синдром // Клиническая лабораторная диагностика. 1999. № 4. С. 3-11.
246. Титов В. Н. Экзогенные и эндогенные патологические факторы (патогены) как причина воспаления // Клиническая лабораторная диагностика. 2004. № 5. С. 3-10.
247. Титов В.Н., Лисицин Д.М., Разумовский С.Д. Методические вопросы и диагностическое значение определения перекисного окисления липидов в липопротеинах низкой плотности. Олеиновая жирная кислота как биологический антиоксидант (обзор литературы) // Клиническая лабораторная диагностика. 2005. № 4. С. 3-10.
248. Точилкина Л.П. Феномен сверхмалых доз, гомеопатия и ФОВ // Химическая и биологическая безопасность. М.: ВИНТИ, 2007. №1. С.4-14.
249. Требования Международного комитета по науке по использованию в экспериментальных исследованиях лабораторных животных // Бюллетень ИКЛАС. 1978. № 24. С. 4-5.
250. Федеральная целевая программа «Уничтожение запасов химического оружия в Российской Федерации». Пост. Правит. РФ № 305, 21.03.1996 г. и № 510, 05.07.2001 г.

251. Федеральные и региональные проблемы уничтожения химического оружия / Под ред. Ю.М. Арского. М.: ВИНТИ, 1999. Вып. 1; 2000. Вып. 2.
252. Федеральный закон «Об охране окружающей среды» №7-ФЗ от 10.01.2002 г. (ред. от 30.12.2008 г. №309).
253. Федеральный закон «Об уничтожении химического оружия» №76-ФЗ от 02.05.1997 г. (ред. от 18.12.2006 г. №232).
254. Федоров Н.А., Корякина И.К., Савицкий А.В. Актуальные проблемы гемосорбции. М., 1981. С. 123-128.
255. Филиппович Ю.Б., Егорова Т.А., Севастьянова Г.А. Практикум по общей биохимии. М., 1982. 250 с.
256. Формазюк В.Е., Осис Ю.Г., Деев А.И. и др. Влияние перекисного окисления липидов на структуру сывороточных липопротеидов // Биохимия. 1983. Т. 48. № 2. С. 331-338.
257. Франке З. Химия отравляющих веществ. М.: Мир, 1973. Т. 1. С. 436. Т. 2. 406 с.
258. Франков И.А. Зависимость токсичности и антихолинэстеразных свойств от химического строения в ряду алкиламидовди-диалкилфосфорных кислот // Химия и применение фосфорорганических соединений. М.: Изд-во АН СССР, 1957. С. 366-371.
259. Фролова А.Д. Гигиеническое регламентирование металлов на основе механизма повреждающего действия: Автореф. дис....д-ра мед. наук. Л., 1990. 41 с.
260. Фролова А.Д., Луковникова Л.В. Изучение процессов биологического окисления *in vitro* для ускорения прогнозирования метаболической активности промышленных ядов // Токсикологический вестник. 1994. № 4. С. 20-24.
261. Фукуто Т. Зависимость между строением фосфорорганических соединений и их ингибиторной активностью в отношении ацетилхолинэстераз // Бюл. ВОЗ. 1972. Т. 44. № 1/3. Ч. 1. С. 33-44.
262. Хадсон Р. Структура и механизм реакций фосфоросоединений. М.: Мир, 1967. 360 с.
263. Хазанов А.И. Функциональная диагностика болезней печени. М.: Медицина, 1988. 304 с.
264. Харечко А.Т., Мягких В.И., Колесников И.О. и др. Штамм *Pseudomonas species 78 Г*, предназначенный для деградации продуктов деструкции фосфорорганических отравляющих веществ // Патент 2154103 RU. Опубл. 10.08.2000.
265. Химическое оружие. Экологические проблемы уничтожения / Под ред. Ю.М. Арского. М.: ВИНТИ, 1997, 1998.
266. Химия и применение фосфорорганических соединений: труды III Всесоюзной конференции. М.: Наука, 1972. 511 с.
267. Химия и применение фосфорорганических соединений: Труды II Всесоюзной

- конференции, Казань, 1959. М.: Изд-во АН СССР, 1962. 631 с.
268. Химия и применение фосфорорганических соединений: Труды IV Всесоюзной конференции. М.: Наука, 1972. 415 с.
269. Хочачка П., Сомеро Дж. Биохимическая адаптация. М.: Мир, 1988. 568 с.
270. Чистяков Б.Е., Полковниченко И.Т., Чапланов П.Е. и др. Фосфорсодержащие поверхностно-активные вещества: Тематический обзор. М.: ЦНИИТЭИ ИНП, 1979. 54 с.
271. Чмутова М.К., Иванова Л.А., Литвина М.Н. и др. Экстракция актинидов растворами диалкилметилфосфонатов из растворов азотной кислоты // Радиохимия. 2002. Т. 44. № 3. С. 240-244.
272. Чмырь И.М., Туманова Е.В., Джилкибаева Г.М. Гербициды на основе производных фосфоновых, фосфиновых и фосфористых кислот. М., 1987. 45 с.
273. Шангин-Березовский Г. Н., Перчихин Ю. А., Колбасин А. А. Влияние малых доз N-нитрозо-N-диметилмочевины на толерантность перепелов к токсичному действию некоторых мутагенов // Эффективность химических мутагенов в селекции: Сб. Ин-та химической физики АН СССР. М., 1980. С. 283-286.
274. Шангин-Березовский Г.Н., Адамов В.Я., Рыхлецкая О.С. и др. Системный характер стимулирующего действия ультрамалых доз супермутагенов // Улучшение культурных растений и мутагенез. М.: Ин-т хим. физики АН СССР, 1982. С. 65-76.
275. Шевченко О. П. Белки острой фазы воспаления // Лаборатория. 1996. № 1. С. 3-6.
276. Шкодич П.Е., Желтобрюхов В.Ф., Клаучек В.В. Эколого-гигиенические аспекты проблемы уничтожения химического оружия. Волгоград: Изд-во ВолГУ, 2004. С. 236.
277. Шувалова Е.П., Антонова Т.В. Прогностическое значение функционального состояния и интенсивности липопероксидации мембран эритроцитов при вирусных гепатитах // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. 1997. № 2. С.46.
278. Шугаев А.И., Абдулхаликов А.С. Эндогенная интоксикация при остром панкреатите и методы ее тестирования // Эфферентная терапия. 1998. Т. 4. № 4. С. 10-14.
279. Электрофорез в клинической лаборатории. М.: Реафарм, 2006. Т.1. 160 с.
280. Энциклопедия «Экометрия». Контроль химических и биологических параметров окружающей среды / Под ред. Л.К. Исаева. СПб., 1998.
281. Энциклопедия по охране и безопасности труда // <http://base.safework.ru/iloenc>
282. Юдакова О.В., Григорьев Е.В. Интенсивность перекисного окисления липидов и антиоксидантная активность, уровень молекул средней массы как показатели эндогенной интоксикации при распространенном перитоните // Клиническая лабораторная диагностика. 2004. № 10. С. 20-22.

283. Юделевич В.И., Комаров Е.В., Ионин Б.И. Фосфорорганические лекарственные препараты // Химико-фармацевтический журнал. 1985. Т. 20. № 6. С. 668-685.
284. Ярошенко А.Ю. Европейская тайга на грани тысячелетий. М.: Гринпис России, 1999. 66 с.
285. Aust S.D. Ferritin as a source of iron and protection from iron-induced toxicities // *Toxicol. Lett.* 1995. V. 82-83. P. 941-944.
286. Bergstrom J., Furst P. Uremic toxins // *Replacement of Renal Function by Dialysis.* Boston, 1983. P. 354-390.
287. Boelsterli Urs. A. Mechanistic Toxicology. The Molecular Basis of How Chemicals Disrupt Biologic Targets. CRC Press Taylor and Francis Group, 2007. 416 с.
288. Caroline Cox. Glyphosate (Roundup) // *Journal of pesticide reform.* 1998. Vol.18. №3.
289. Cox C. Responding to Chemical Goliath (Glyphosate) // *Journal of pesticide reform* // Autumn, 1998. V. 18. № 3.
290. Curry Y.D., Nicholson D.A. Oligophosphonates // *Topics Phosphorus Chem.* 1972. V.7. P. 37-102.
291. Daruich J., Zirulnik F., Gimenez M. S.Effect of the herbicide glyphosate on enzymatic activity in pregnant rats and their fetuses // *Environmental Research.* 2001. V. 85. № 3. P. 226-231.
292. Davenas E., Bauvais F., Amara J., et el. Human basophil degranulation triggered by very diluted antiserum against Ig E. // *Nature (international weekly journal of science).* 1988. V. 333. № 6176. P. 816-818.
293. Dictionary of organophosphorus compounds / Ed. R.S. Edmundson. L.: Chapman and Hall, 1987. 1000 p.
294. Efremenko E.N., Lyagin I.V., Senko O.V., et. el. Application of gel systems with various biocatalysts detoxifying neurotoxic agents for pollution control, water purification, and self-defense // In book: "Sol-gel methods for materials processing" Ser. NATO Science for Peace and Security. Eds. P. Innocenzi e.a. Netherlands: Springer. 2008. P.77-89.
295. Emsley J., Hall D. The chemistry of phosphorus. L.: Harper Row, 1976. 563 p.
296. Eto M. Organophosphorous Pesticides: Organic and Biological Chemistry. Cleveland, Ohio: CRC Press, 1974.
297. Fest C., Schmidt K.J. The chemistry of organophosphorus pesticides. Springer Verlag. Berlin-Heidelberg-New York, 1973. 539 p.
298. Fest Ch., Schmidt K.J. The chemistry of organophosphorus pesticides. Berlin Springer, 1982. 447 p.
299. Freedman L.D., Doak G.O. The preparation and properties of phosphonic acids // *Chem. Rev.* 1957. V. 57. № 3. P. 479-523.
300. Fukuto T.R., Metcalf R.L. Isomerization of β -ethylmercaptoethyl diethyl thionophosphate (Systox). *J.Am.Chem.Soc.* 1954. V. 76. P. 103.

301. Garrou P.E. Transition-metal-mediated phosphorus-carbon bond cleavage and its relevance to homogeneous catalyst deactivation // *Chem. Rev.* 1985. V.85. № 3. P. 171-184.
302. Glyphosate and Standard Toxicology Studies // Monsanto Company, Background-er. 2002. P. 1-5. // URL: http://monsanto.com/products/techandsafety/herbicide_scipubs.asp
303. Glyphosate. Herbicide factsheet // *Journal of pesticide reform.* 2004. V. 24. № 4. P. 10-15.
304. Guo-Min Zuo, Zhen-Xing Cheng, Guo-Wen Li, et al. Photoassisted Reaction of Chemical Warfare Agent VX Droplets under UV Light Irradiation // *J. Phys. Chem. A.* 2005. № 109. P. 6912-6918.
305. Gutteridge J.M.C., Richmond R., Halliwell B. Inhibition of the iron-catalysed formation of hydroxyl radicals from superoxide and of lipid peroxidation by desferrioxamine. *Biochem. J.* 1979. V. 184. № 2. P. 469-472.
306. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 1984. V. 219. № 1. P. 1-14.
307. Hardell L., Eriksson M. A Case-Control Study of Non-Hodgkin Lymphoma and Exposure to Pesticides // *Cancer.* 1999. Vol. 85. № 6. P. 1353-1360.
308. Heath D.F. Organophosphorus poisons. Anticholinesterases and related compounds. Oxford: Pergamon press, 1961. 404 c.
309. Hendrick J.P., Hartl F.U. Molecular chaperon functions of heat shock proteins // *Annu. Rev. Biochem.* 1993. V. 62. P. 349-384.
310. Kafarski P., Leiczak B., Mastalerz P. Phosphonopeptides – synthesis and biological activity // *Beitr. Wirkstofforsch.* 1985. H. 25. P.3-77.
311. Kafarski P., Mastalerz P. Aminophosphonates: natural occurrence, biological properties // *Beitr. Wirkstofforsch.* 1984. H. 21. P.3-110.
312. Kehner J.P. Free Radicals as Mediators of Tissue Injury and Diseases // *Crit. Rev. Toxicol.* 1993. V. 23. P. 21-48.
313. Kukhar V.P., Hudson H.R. Aminophosphonic and Aminophosphonic acids. New York: John Wiley & Sons, 2000.
314. Maier L., Advances in the chemistry of aminophosphonic acids // *Phosph. and Sulf.* 1983. V. 14. № 3. P. 295-322.
315. Menn J.J., McBain J.B. New aspects of organophosphorus pesticides. IV. Newer aspects of the metabolism of phosphonate insecticides // *Residue Rev.* 1974. V. 53. P. 35-51.
316. Methoden der organischen Chemie (Houben-Weyl) // *Organische Phosphor-Verbindungen.* 4. Aufl. Stuttgart: Thieme. Bd. XII/1. 1963. 683 s.
317. More S. H., Breloe, M., von Bonin A. Eukaryotic heat shock proteins as molecular links in innate and adaptive immune responses: Hsp60-mediated activation of cytotoxic T cells // *Int. Immunol.* 2001. V. 13. P. 1121-1127.

318. Munro N.B., Talmage S.S., Griffin G.D., et al. The Sources, Fate and Toxicity of Chemical Warfare Agent Degradation, Products // Environmental Health Perspectives. 1999. V. 107. № 12. P. 933-974.
319. Paganelli A., Gnazzo V., Acosta H., et. al. Glyphosate-based herbicides produce teratogenic effects on vertebrates by impairing retinoic acid signaling // Chem. Res. Toxicol., 2010, 23 (10), p. 1586–1595.
320. Prajer K., Rachon J. α -Aminophosphonsaure // Ztschr. Chem. 1975. Bd. 15. S. 209-215.
321. Quin L.D. The natural occurrence of compounds with the carbonphosphorus bond // Topics Phosphorus Chem. 1967. V. 4. P. 23-48.
322. Redmore D. The chemistry of C-P-N systems // Topics Phosphorus Chem. 1976. V. 8. P. 515-585.
323. Sekine M. Chemistry of acylphosphonic acids and related compounds // J. Synth. Org. Chem. Jap. V. 38. № 3. 1980. P. 244-257.
324. Sies H. Oxidative stress. N.Y.: Academic Press. 1985.
325. Tanahashi K., Imada A. Phagocytic activity and oxygen radicals production of neutrophils in patients with chronic renal failure // Nippon. Jinzo. Gakkai. Shi. 1991. V. 33. № 6. P. 565-574.
326. Wagner G.W., Yang Y.-C. Rapid Nucleophilic Oxidative Decontamination of Chemical Warfare Agents // Ind. Eng. Chem. Res. 2002. V. 41. № 8. P. 1925-1928.
327. Worms K.H., Schmidt-Dunker M. Phosphonic acids and derivatives // Organic phosphorus compounds. N.Y.: Wiley, 1973. V. 7. 849 p.

Научное издание

Ольга Михайловна Плотникова,
Светлана Николаевна Лунева,
Антон Михайлович Корепин,
Николай Николаевич Матвеев,
Ирина Викторовна Савинова

**Биологическая активность метилфосфонатов:
влияние метилфосфоновой кислоты на гомеостаз,
методы исследования**

Монография

Редактор Н.Л. Борисова

Подписано в печать	Формат 60×84	1/16	Бумага тип. № 1
Печать трафаретная	Усл. печ. л. 7,5		Уч.-изд. л. 7,5
Заказ	Тираж		Цена свободная

РИЦ Курганского государственного университета.
640668, г. Курган, ул. Гоголя, 25.
Курганский государственный университет.