

*На правах рукописи*

**КОРЕПИН АНТОН МИХАЙЛОВИЧ**

**ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ БЕЛКОВ И СОДЕРЖАНИЕ МАРКЕРОВ  
ЭНДОГЕННОЙ ИНТОКСИКАЦИИ В КРОВИ ЛАБОРАТОРНЫХ  
МЫШЕЙ ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ МЕТИЛФОСФОНОВОЙ КИСЛОТЫ**

03.01.04 – Биохимия

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Нижний Новгород

2011

Работа выполнена в Федеральном государственном учреждении «Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» имени академика Г.А. Илизарова» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации и Межрегиональной лаборатории экотоксикологии филиала Государственного учреждения «Территориальный государственный экологический фонд Курганской области» Регионального центра по обеспечению государственного экологического контроля и мониторинга объектов по хранению и уничтожению химического оружия по Курганской области

**Научные руководители:** доктор биологических наук  
**Лунёва Светлана Николаевна,**  
кандидат химических наук  
**Плотникова Ольга Михайловна**

**Официальные оппоненты:** доктор биологических наук, профессор  
**Контрщикова Клавдия Николаевна**  
ГОУ ВПО «Нижегородская государственная медицинская академия», г. Нижний Новгород,

доктор медицинских наук, профессор  
**Львовская Елена Ивановна**  
ФГОУ ВПО «Уральский государственный университет физической культуры», г. Челябинск

**Ведущая организация:**

ГОУ ВПО «Челябинская государственная медицинская академия», г. Челябинск

Защита диссертации состоится «24» февраля 2011 г. в \_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д212.166.15 при Нижегородском государственном университете им. Н.И. Лобачевского по адресу: 603950, г. Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГОУ ВПО Нижегородский государственный университет по адресу: 603950, г. Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23.

Автореферат разослан «14» января 2011 г.

**Ученый секретарь диссертационного совета,**

кандидат биологических наук, доцент



**Копылова**  
**Светлана Вячеславовна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность исследования.** В настоящее время фосфорорганические соединения (ФОС) активно исследуются в ведущих научных центрах мира. Большинство известных ФОС являются веществами антропогенного характера, многие из них впервые были получены как сильнейшие пестициды (Кабачник, 1962). Интерес к проблеме вызван, во-первых, широким использованием ФОС в промышленности (Мельников, 1997), медицине, быту и сельском хозяйстве (Нифантьев, 1996; Caroline, 1998), во-вторых, начавшимся в России уничтожением фосфорорганических отравляющих веществ (Холстов, 2004).

До недавнего времени в России насчитывалось порядка 40 тысяч тонн фосфорорганических отравляющих веществ (Белецкая, 1995). В Щучанском районе Курганской области, как и в Кировской области, в настоящее время функционирует завод по уничтожению химического оружия (ХО). В основе уничтожения ХО лежит технология химического взаимодействия ФОС (в Курганской области: зарин, зоман и V-газы) с органическими основаниями, например, моноэтаноламином или бутилатом калия (Белавинцев, 1999; Холстов, 2004). В результате реакции получают метилфосфонаты – соответствующие соли и эфиры метилфосфоновой кислоты (МФК). Зарубежный опыт уничтожения ХО подтверждает возможность загрязнения метилфосфонатами природных сред (DeFrank, 2003; Frei, 1993; Munro, 1999). МФК была обнаружена спустя 10 лет после загрязнения сухой почвы на полигоне хранения ХО Дагуэй в штате Юта США (Савельева, 2002).

Существует ряд фосфорсодержащих пестицидов, содержащих в своем строении фрагмент МФК. Общеизвестный гербицид глифосат (с торговым наименованием «Раундап») в результате биохимической деградации в почвах преобразуется в производное МФК - аминометилфосфонат (Caroline, 1998), которое медленно гидролизует до МФК. МФК объединяет большую гетерогенную по свойствам группу алкилфосфонатов, являясь ядром химического строения.

Уникальные свойства молекулы МФК, такие как бифильность, наличие малополярной связи С-Р, близкие фосфорной кислоте константы диссоциации могут приводить к ее неоднозначному поведению в биологических средах (Кононова, 2002; Мельников, 1987; Савельева, 2002). Ряд исследований, касающихся биоремедиации почв от ФОС, доказывают существование микроорганизмов использующих С-Р-лиазный ферментный комплекс для

расщепления МФК, что подтверждает возможность участия веществ со связью С-Р в метаболических процессах.

Вопрос влияния МФК на представителей растительного и животного мира практически не изучен. Существуют отдельные данные о влиянии МФК на рост и ферментативную активность растений (Огородникова, 2007; Серебрякова, 2007). Наличие разветвленной сети из углеводородных радикалов фосфолипидов на поверхности плазматических мембран позволяет предположить возможность специфического взаимодействия молекул МФК с плазмолеммой и интегральными белками. Не исключено проникновение МФК через гематоэнцефалический барьер (Ашмарин, 1999; Глебов, 1984).

Обладая специфическим строением и свойствами, МФК может оказывать влияние на процессы окислительной модификации белков и липидов, вызывая изменения в содержании продуктов перекисного окисления белков (ПОБ), также приводить к накоплению основных маркеров эндогенной интоксикации – олигопептидов (ОП) и веществ низкой и средней молекулярных масс (ВНСММ) в крови, по содержанию которых можно будет сделать выводы об участии МФК в процессах протеолиза или других путей белковой деградации.

**Цель исследования:** изучить влияние МФК на показатели перекисного окисления белков и эндогенной интоксикации при подкожном введении лабораторным мышам.

**Задачи исследования:**

1. Изучить влияние подкожного введения МФК лабораторным мышам в дозе 2 мг/кг массы животного в зависимости от времени после инъекции растворов от 12 до 120 часов. Определить *время максимального изменения* значений изучаемых биохимических показателей крови у лабораторных мышей после введения МФК.

2. Изучить особенности изменения содержания продуктов ПОБ и основных маркеров эндогенной интоксикации в крови лабораторных мышей в зависимости от введения *различных доз* МФК (дозозависимый эффект) и определить дозы, оказывающие наибольшее влияние.

3. Оценить обратимость изменений изучаемых биохимических показателей крови лабораторных мышей вызываемых различными дозами МФК через 3-30 суток после однократного введения МФК.

4. Отметить наиболее информативные биохимические показатели, подтверждающие влияние МФК на организмы лабораторных мышей.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

1. МФК оказывает влияние на содержание общего белка и белковых фракций, маркеров эндогенной интоксикации: ВНСММ и ОП в крови лабораторных мышей, а также вызывает изменения в протекании процессов перекисного окисления белков. Причем, наибольшие изменения изучаемых биохимических показателей наблюдаются через 72 часа после введения МФК. А нормализация значений большинства показателей происходит через 120 часов после введения МФК в дозе 2 мг/кг массы животного.

2. МФК обладает ярко выраженным дозозависимым эффектом. При введении МФК в дозах 2,  $10^{-3}$  мг/кг массы животного через 72 часа происходит ингибирование процессов окислительной модификации белков и активация белкового катаболизма, а в дозе  $10^{-15}$  мг/кг через 72 часа наблюдается усиление процессов ПОБ и возникновение синдрома эндогенной интоксикации. Через 30 суток после введения различных доз МФК самцам лабораторных мышей отмечается нормализация содержания маркеров эндогенной интоксикации.

**Научная новизна исследования.** МФК впервые рассматривается как потенциальное загрязняющее вещество природных сред, оказывающее влияние на организмы теплокровных животных.

Впервые изучено влияние МФК на ряд биохимических показателей крови теплокровных животных. Показано, что МФК оказывает достоверное влияние на биохимические показатели и обладает ярко выраженным дозозависимым эффектом.

Впервые обнаружено, что низкие дозы МФК оказывают воздействие на процессы окислительной модификации белков и катаболизма.

Впервые оценена чувствительность биохимических методов к введению МФК на уровне низких доз ( $10^{-15}$ ,  $10^{-18}$  мг/кг массы животного). Показано, что через 72 часа после введения МФК в дозе  $10^{-15}$  мг/кг массы животного происходит рост концентрации карбонильных производных белков (продуктов ПОБ), увеличение фракций ОП в плазме и ВНСММ в плазме и эритроцитах лабораторных мышей.

**Научно-практическая значимость исследования, область внедрения.**

Полученные результаты исследования акцентируют внимание на важности вопроса контроля уровня загрязнения метилфосфонатами действующих и бывших объектов уничтожения химического оружия, рациональности широкого использования фосфорсодержащих пестицидов на сельскохозяйственных угодьях.

Комплексное изучение влияния МФК на содержание продуктов ПОБ и маркеров эндогенной интоксикации в крови теплокровных животных позволило выделить эти показатели как наиболее информативные, которые в совокупности с рядом показателей других обменных процессов можно использовать в экологическом мониторинге животного мира для оценки уровня воздействия на теплокровные организмы фосфонатов и подобных загрязняющих веществ.

Интеграция данных об изменении изучаемых показателей под действием различных доз МФК в область клинико-диагностических исследований позволит использовать их в качестве одних из маркеров интоксикации человека и животных низкими дозами фосфорорганических отравляющих веществ.

Результаты проведенного исследования использовались для разработки аттестованной в Межрегиональной лаборатории экотоксикологии Регионального центра по обеспечению государственного экологического контроля и мониторинга объектов по хранению и уничтожению химического оружия по Курганской области (РЦ СГЭКиМ) «Методики выполнения измерений биохимических показателей в плазме (сыворотке) крови мелких теплокровных животных фотометрическим методом», свидетельство об аттестации ФГУП «УНИИМ» № 224.11.03.052/2009 от 17.06.2009 г.

**Апробация работы.** Материалы диссертационного исследования доложены: на региональной конференции молодых ученых, посвященной году молодежи в России «Молодежный научный потенциал в инновационном развитии Уральского региона» (КГСХА, 2009); на VII всероссийской научно-практической конференции «Проблемы региональной экологии в условиях устойчивого развития» (Киров, 2009); на II всероссийской научно-практической конференции «Состояние окружающей среды и здоровье населения» (Курган, 2009); на региональной молодежной научно-практической конференции с международным участием «Экологобезопасные и ресурсосберегающие технологии и материалы» (Улан-Удэ, 2010); на всероссийской молодежной научной конференции с международным участием «Биология будущего: традиции и инновации» (Екатеринбург, 2010); на международной научно-практической конференции «Экология. Риск. Безопасность» (Курган, 2010); на международной конференции «Антропогенная трансформация природной среды» (Пермь, 2010).

**Декларация личного участия автора.** Экспериментальные исследования выполнялись автором лично. Обработка полученных данных, их интерпретация и оформление осуществлены автором самостоятельно.

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 16 печатных работ, которых 3 статьи опубликовано в изданиях, рекомендуемых ВАКом для публикации результатов кандидатских диссертаций.

**Объем и структура работы.** Работа изложена на 115 страницах машинописного текста, состоит из введения, 3 глав, заключения, практических рекомендаций, выводов, списка литературы, 12 таблиц, 37 рисунков. Библиографический указатель включает 225 источников: из них 178 – отечественные, 47 – зарубежные. Диссертационное исследование выполнено по плану НИР Межрегиональной лаборатории экотоксикологии филиала ГУ «Экофонд» РЦ СГЭКиМ.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Материалы и методы исследования.** Исследования были проведены на белых лабораторных мышах линии СВА (540 животных) - самцах и самках в возрасте 2-х месяцев, массой  $25 \pm 2$  г.

Материалом исследования служили: плазма и эритроцитарная масса крови. В ходе выполнения исследования применялись экспериментальные, биохимические и статистические методы.

Для изучения влияния МФК на биохимические показатели белкового обмена лабораторные мыши были разбиты на группы и подгруппы животных. Схема эксперимента показана в таблице 1.

В ходе эксперимента опытным лабораторным мышам вводились нейтрализованные изотонические растворы МФК подкожно в брюшинной области объемом 0,04 мл одноразовым инсулиновым шприцем. Контрольным группам подкожно вводился физиологический раствор объемом эквивалентным опытной группе. Введение осуществлялось в первой половине дня.

Эвтаназия осуществлялась натошак методом декапитации в первой половине дня. Полученную цельную кровь центрифугировали при 3000 об/мин 10 мин для получения плазмы и эритроцитарной массы.

Электрофоретическое разделение белковых фракций проводили на системе Paragon (Beckman, США); общий белок определяли спектрофотометрическим биуретовым методом Кингслея–Вейксельбаума; продукты ПОБ определяли в белковом осадке по реакции с 2,4-

динитрофенилгидразином при длинах волн 270 нм – альдегидфенилгидразоны (АФГ), 363 нм и 370 нм - кетонфенилгидразоны (КФГ); олигопептиды определяли в супернатанте методом Лоури, регистрируя оптическую плотность окрашенных комплексов при 750 нм; ВНСММ определяли в супернатанте путем регистрации спектра поглощения исследуемого раствора в зоне ультрафиолета в диапазоне 238-298 нм с шагом в 1 нм по методу М.Я. Малаховой (Малахова, 1987).

Статистическую обработку данных проводили с использованием критериев непараметрической статистики: при исключении выбросов использовали метод Титъена-Мура, проверяя минимум и максимум значений выборки; достоверность различий между двумя выборками определяли по W-критерию Вилкоксона-Манна-Уитни для независимых выборок. Результаты анализов усредняли с помощью медианы, на основании которой считали различия в процентах (%) опытных и контрольных групп. Факторный анализ проводили методом главных факторов, метод оценки общностей – анализ главных компонент (Гайдышев, 2001; Гланц, 1998). При статистической обработке результатов исследования был использован интегратор модульной программы AtteStat 1.0 для программы Microsoft Excel, разработанный в лаборатории информационно-вычислительного центра ФГУН «РНЦ «ВТО» им. академика Г.А. Илизарова» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации И.П. Гайдышевым.



Таблица 1.

## Схема экспериментальной части исследования

1 группа. Референтные значения	2 группа. Установление времени максимального изменения изучаемых биохимических показателей			3 группа. Изучение дозозависимого эффекта			4 группа. Изучение нормализации биохимических показателей				
Интактные группы, здоровые животные	Время эксперимента	Опытные группы, введение МФК в дозе 2 мг/кг массы животного	Контрольные группы, физиологический раствор	Дозы МФК, мг/кг массы	Забор крови через 72 часа		Время эксперимента	Опытные группы, введение МФК в дозах $10^{-3}$ , $10^{-15}$ , мг/кг массы	Контрольные группы, физиологический раствор		
					Опытные группы, введение МФК в различных дозах	Контрольные группы, физиологический раствор					
♀ 20 особей	12 часов	♀ 10 особей	♀ 10 особей	$1,0 \cdot 10^{-3}$	♀ 10 особей	♀ 20 особей ♂ 20 особей	3-е суток (данные из 2 гр.)	♂ 10 особей $1,0 \cdot 10^{-3}$	♂ 10 особей (данные из 2 гр.)		
		♂ 10 особей	♂ 10 особей		♂ 10 особей						
	24 часов	♀ 10 особей	♀ 10 особей	$1,0 \cdot 10^{-6}$	♀ 10 особей		6 суток	♂ 10 особей $1,0 \cdot 10^{-3}$	♂ 10 особей $1,0 \cdot 10^{-15}$	♂ 10 особей	
		♂ 10 особей	♂ 10 особей		♂ 10 особей						
	48 часов	♀ 10 особей	♀ 10 особей	$1,0 \cdot 10^{-9}$	♀ 10 особей		12 суток	♂ 10 особей $1,0 \cdot 10^{-3}$	♂ 10 особей $1,0 \cdot 10^{-15}$	♂ 10 особей	
		♂ 10 особей	♂ 10 особей		♂ 10 особей						
	♂ 20 особей	72 часов	♀ 10 особей	♀ 10 особей	$1,0 \cdot 10^{-12}$		♀ 10 особей	18 суток	♂ 10 особей $1,0 \cdot 10^{-3}$	♂ 10 особей $1,0 \cdot 10^{-15}$	-
			♂ 10 особей	♂ 10 особей			♂ 10 особей				
		96 часов	♀ 10 особей	♀ 10 особей	$1,0 \cdot 10^{-15}$		♀ 10 особей	30 суток	♂ 10 особей $1,0 \cdot 10^{-3}$	♂ 10 особей $1,0 \cdot 10^{-15}$	
			♂ 10 особей	♂ 10 особей			♂ 10 особей				
		120 часов	♀ 10 особей	♀ 10 особей	$1,0 \cdot 10^{-18}$		♀ 10 особей	Контроль 18, 30 суток не делался ввиду отсутствия достоверных отличий между предыдущими контрольными группами			
			♂ 10 особей	♂ 10 особей			♂ 10 особей				
40 мышей		240 мышей			160 мышей			100 мышей			

Примечание: ♂, ♀ - самцы и самки лабораторных мышей. Контрольные и опытные группы лабораторных мышей содержались в стандартных, однотипных условиях вивария, получали питание и воду в достаточном количестве. Эвтаназия осуществлялась методом декапитации с соблюдением всех биоэтических правил.

## Результаты собственного исследования и их обсуждение.

Результаты проведенного изучения показателей белкового обмена у лабораторных мышей через 12-120 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.

У самцов наиболее часто отмечалась неспецифическая гиперпродукция  $\alpha$ 1-,  $\alpha$ 2-глобулинов через 12 часов;  $\alpha$ 1-,  $\beta$ -глобулинов максимально через 72 часа после введения МФК в дозе 2 мг/кг массы животного (см. рис. 1).

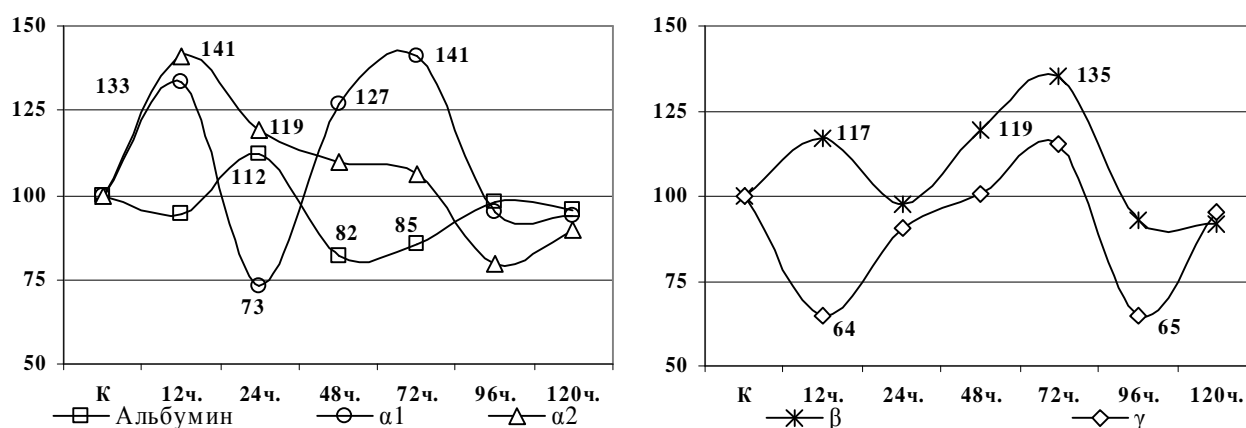


Рис. 1. Изменение содержания белковых фракций (в % относительно контрольных групп) в плазме самцов в зависимости от времени после введения МФК в дозе 2 мг/кг массы животного. Примечание. К – контрольная группа. Значения отличий в процентах указаны в случае статистически значимых различий при  $p \leq 0,05$ .

В отличие от самцов, у самок через 12 часов после введения МФК наблюдалась гипер- $\gamma$ -глобулинемия на 22% сопровождаемая понижением  $\alpha$ 1-,  $\beta$ -глобулинов на 39% и 15%, соответственно, а через 72 часа был отмечен рост общего белка на 16%, за счет гиперпродукции  $\alpha$ 2-,  $\beta$ -глобулинов на 50% и 18%, соответственно, что сопровождалось увеличением концентрации альбумина в крови на 27% (см. рис. 2).

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

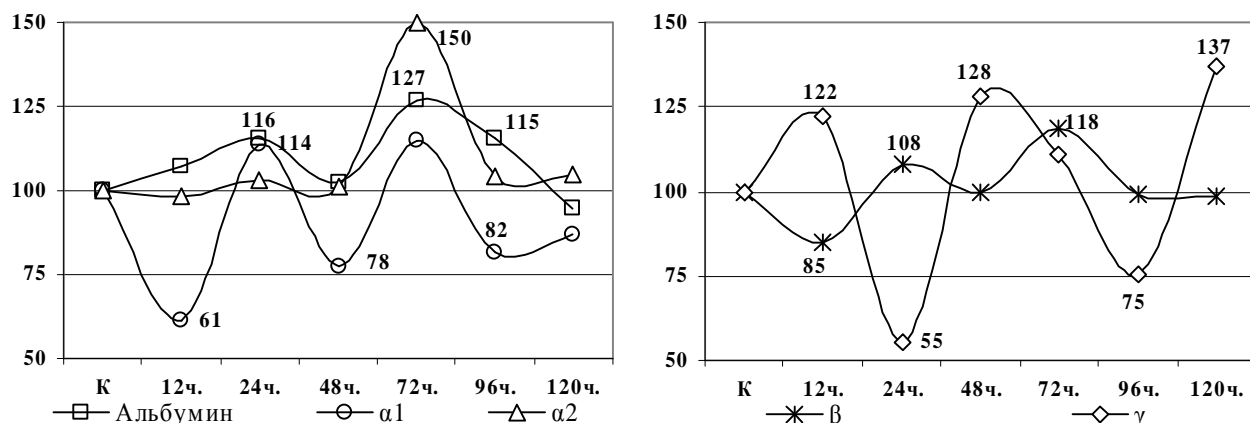


Рис. 2. Изменение содержания белковых фракций (в % относительно контрольных групп) в плазме самок в зависимости от времени после введения МФК. Примечание. см. рис. 1.

После введения МФК в дозе 2 мг/кг лабораторным мышам наблюдалось изменение содержания продуктов ПОБ и маркеров эндогенной интоксикации.

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% (см. рис. 3). У самок лабораторных мышей 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%.

Спустя 24 часа после введения МФК в дозе 2 мг/кг 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. 3.

Анализ крови через 48 часов после подкожной инъекции опытным группам 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.

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%. В крови самцов наибольшие изменения были отмечены для КФГ – снижение на 41% и ВНСММ в плазме – снижение на 17%.

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 (см. рис. 3).

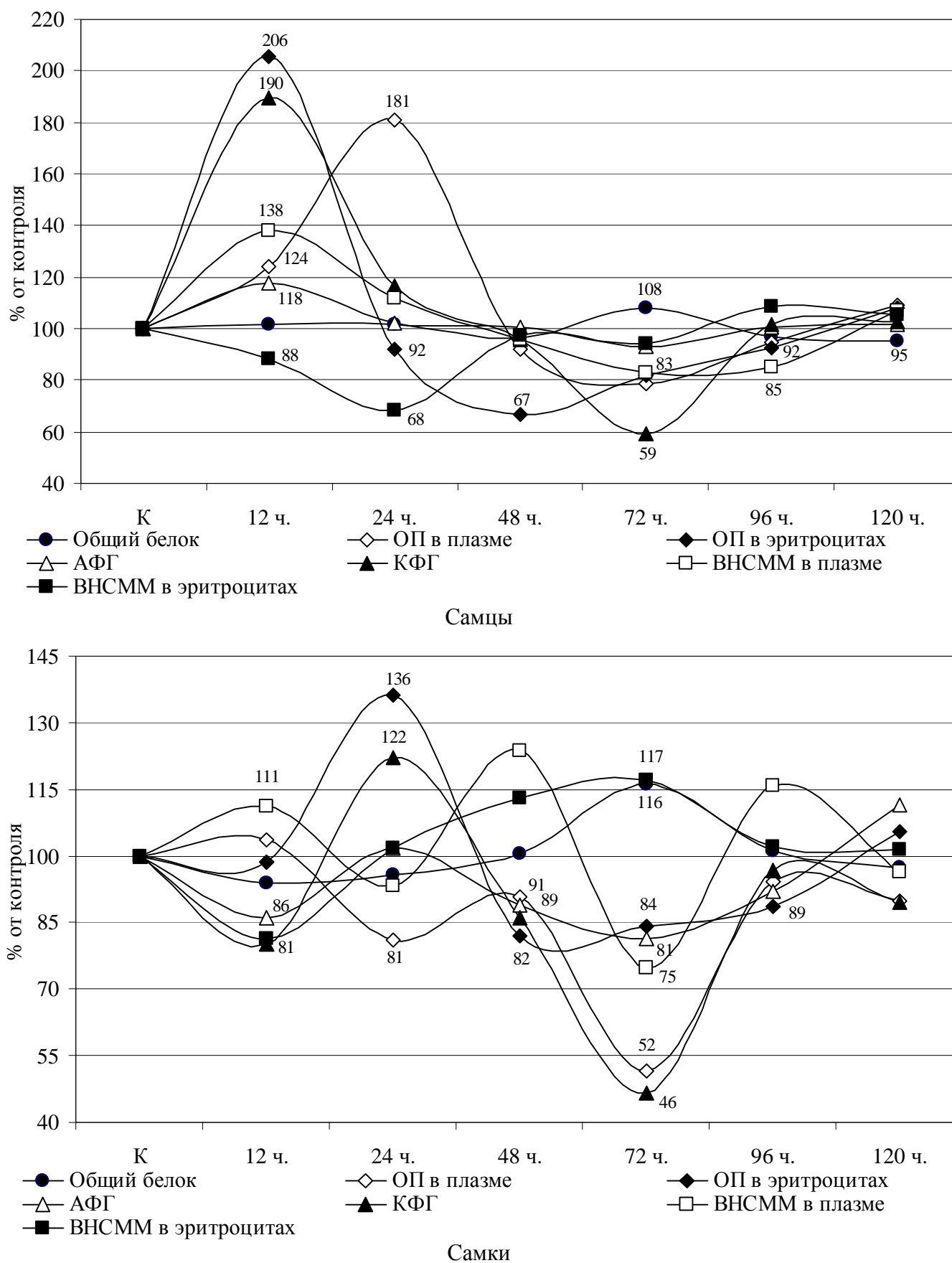


Рис. 3. Суммарная картина изменения значений показателей белкового обмена у самцов и самок лабораторных мышей в зависимости от времени после введения МФК в дозе 2 мг/кг относительно контрольных групп в %. Примечание: указаны значения достоверных отличий в % при  $p \leq 0,05$ .

Нами был предложен коэффициент информативности  $K_I$ , который рассчитывался по формуле (1):

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

где  $\sum\%_t$  – суммарный процент достоверных отличий через  $t$  часов 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. 4).

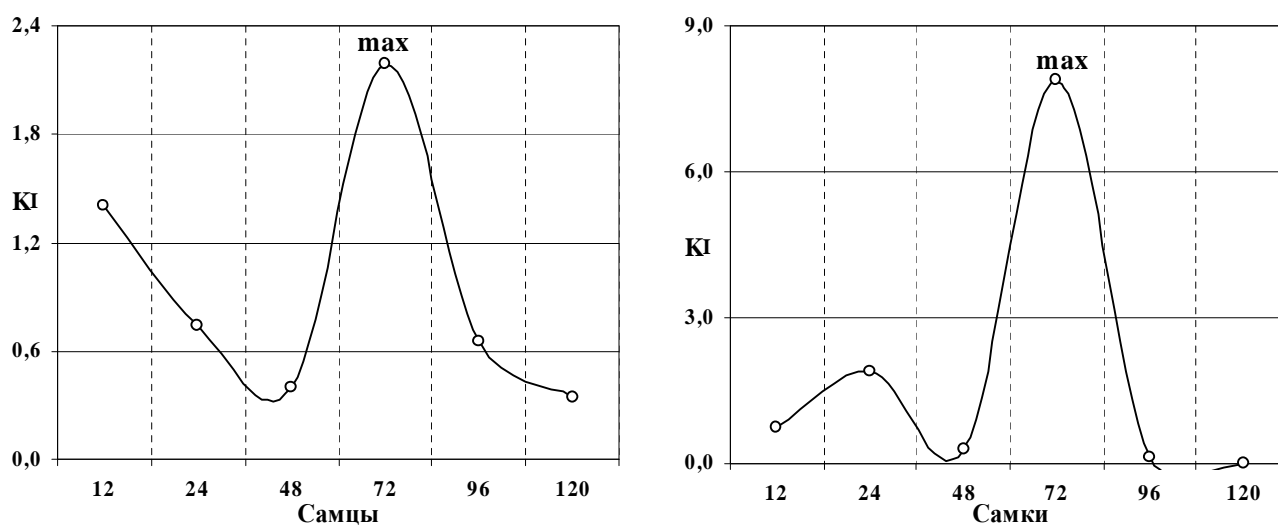


Рис. 4. Изменение коэффициента информативности биохимических показателей в зависимости от времени после введения МФК в дозе 2 мг/кг массы животного группам самцов и самок лабораторных мышей относительно контрольных групп. Примечание.  $K_I$  – значение коэффициента информативности, max – максимум  $K_I$  на графике.

Проведенный факторный анализ полученных результатов 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 массы животного описывались факторами работы АОС, выведением эндотоксинов и сорбцией эндотоксинов эритроцитами.

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 после введения МФК. На рис. 5 показаны изменения концентрации ОБ, продуктов

ПОБ, ОП и ВНСММ в крови самцов и самок лабораторных мышей через 72 часа после введения МФК в дозе 2 мг/кг.

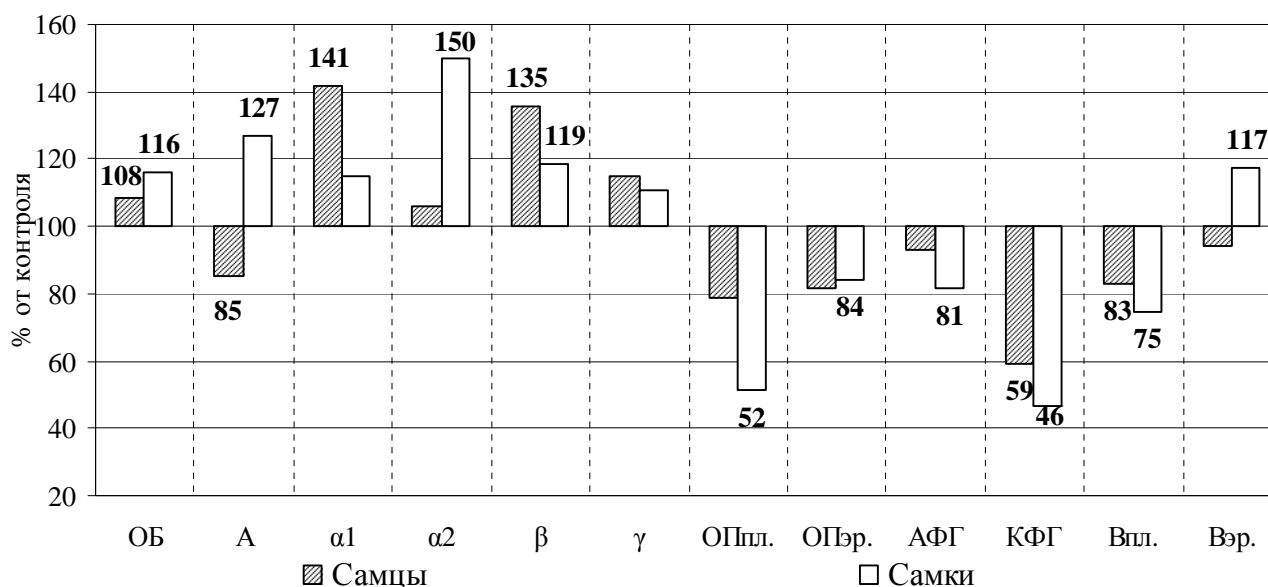


Рис. 5. Сравнительное изменение изучаемых биохимических показателей крови в % относительно контрольных групп самцов и самок через 72 часа после введения МФК в дозе 2 мг/кг. Примечание: ОБ – общий белок; А – альбумин; α1, α2, β, γ – фракции глобулинов; ОПл., ОПэр. – содержание ОП в плазме и эритроцитах; Впл., Вэр. – содержание ВНСММ в плазме и эритроцитах; АФГ, КФГ – фракции ПОБ. Представлены значения отличий в % в случае достоверных отличий при  $p \leq 0,05$ .

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 МФК в различных дозах лабораторным мышам приводило к небольшому изменению общего белка. 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. 6). Было отмечено, что при введении самцам лабораторных мышей МФК в дозе 2 мг/кг наблюдалась гиперпродукция α1-, β-глобулинов на 35% и 41%, соответственно. Подобным образом на содержание глобулинов оказывала МФК в дозе  $10^{-15}$  мг/кг: рост α1-, α2-, 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 α2-глобулинов наблюдался на 50%, 112% и 34%, соответственно. Стоит отметить, что МФК оказала наибольшее влияние на распределение глобулинов в крови самцов при введении в дозе  $10^{-15}$  мг/кг, самок при введении в дозе 2 мг/кг.

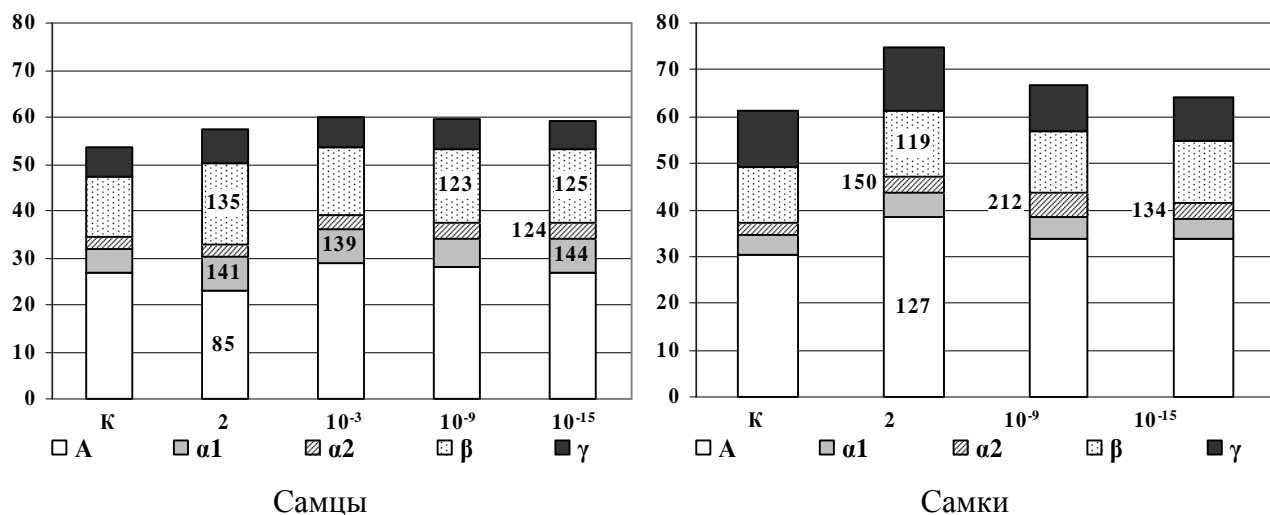


Рис. 6. Изменение содержания белковых фракций (в г/л) в плазме самцов и самок через 72 часа в зависимости от вводимых доз МФК. Примечание. К – контрольная группа. По оси абсцисс значения концентраций МФК в мг/кг массы животного. Указаны процентные отличия от контрольных групп в случае достоверных отличий при  $p \leq 0,05$ .

На рис. 7 приведены данные изменения содержания продуктов ПОБ и маркеров эндогенной интоксикации в крови самцов лабораторных мышей при введении различных доз МФК.

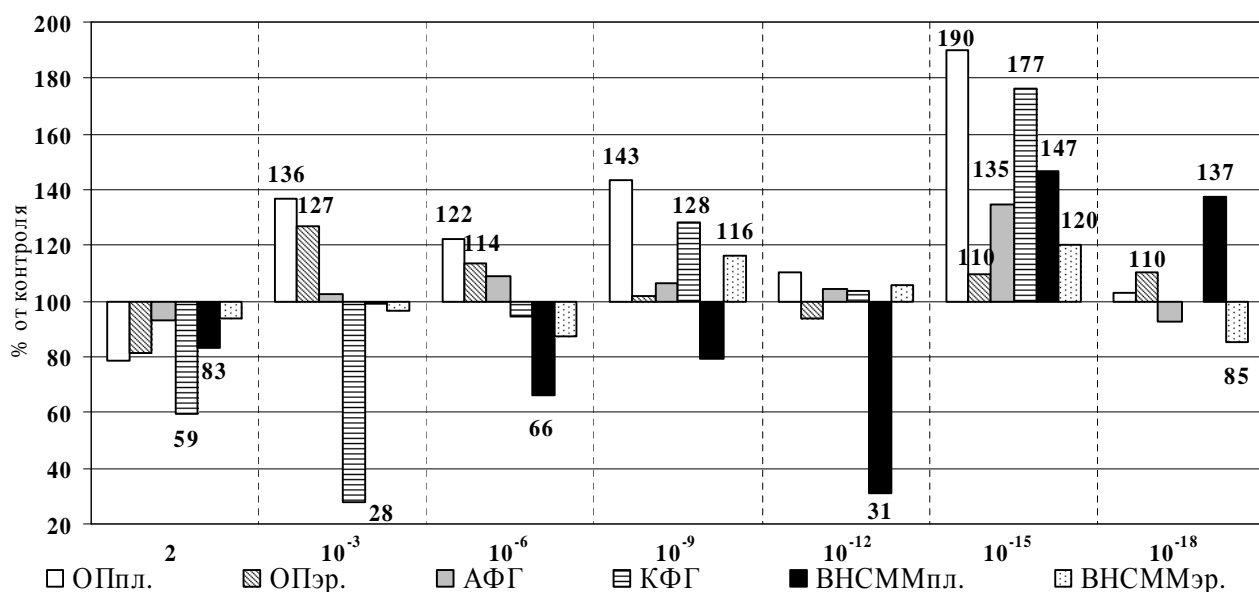


Рис. 7. Изменение значений биохимических показателей самцов лабораторных мышей в % относительно контрольных групп через 72 часа после введения различных доз МФК. Примечание. Представлены значения отличий в % в случае достоверных отличий при  $p \leq 0,05$ . По оси абсцисс указаны дозы МФК в мг/кг веса тела животного.

Увеличение содержания ОП в плазме и эритроцитах, свидетельствующее об усилении катаболических процессов, наблюдалось при введении МФК в дозах 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-9</sup>, 10<sup>-15</sup> мг/кг массы животного. Максимальное увеличение ОП в плазме на 90% было отмечено при введении МФК в дозе 10<sup>-15</sup> мг/кг, а в эритроцитах на 27%

при введении МФК в дозе  $10^{-3}$  мг/кг массы животного.

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

Обращает 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, уменьшалась на 15% при введении МФК в дозе  $10^{-18}$  мг/кг массы животного (рис. 7).

У самок лабораторных мышей наибольшие отличия изучаемых показателей отмечались при введении МФК в дозе  $10^{-3}$  мг/кг (рис. 8).

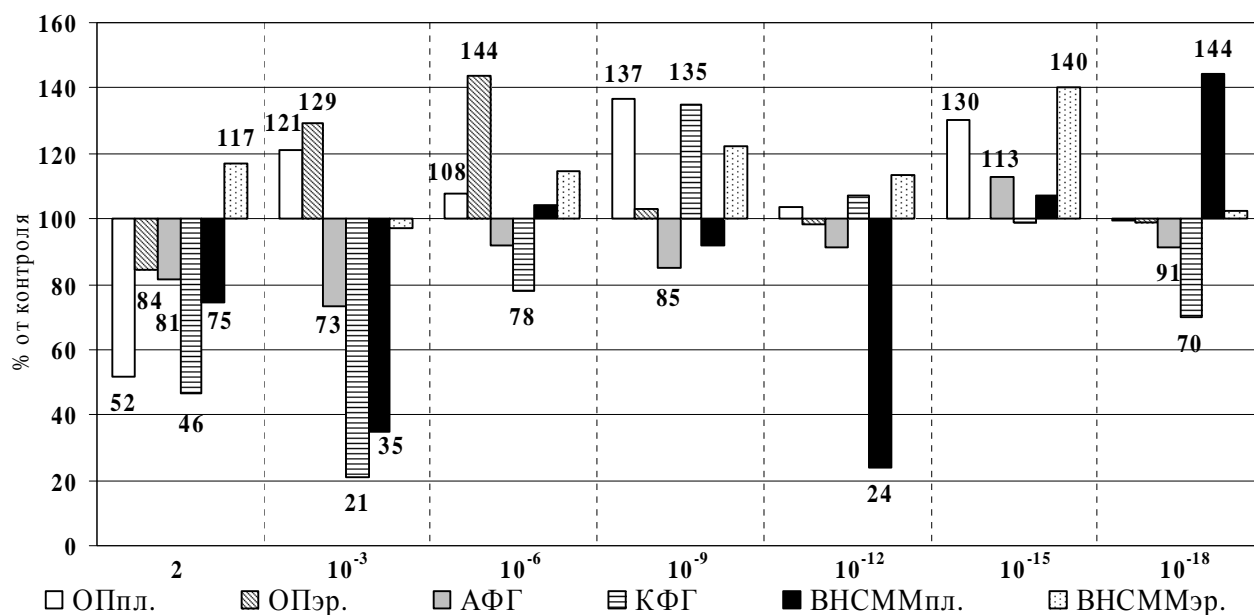


Рис. 8. Изменение значений биохимических показателей самок лабораторных мышей в % относительно контрольных групп через 72 часа после введения различных доз МФК.

Примечание. Представлены значения отличий в % в случае достоверных отличий при  $p \leq 0,05$ . По оси абсцисс указаны дозы МФК в мг/кг массы животного.

Как и у самцов происходило подобное увеличение ОП в плазме и эритроцитах на 21%, 29%, соответственно. Также наблюдалось уменьшение продуктов ПОБ (АФГ на 27%, КФГ на 79%) и снижение ВНСММ в плазме на 65%. В отличие от реакции организмов мышей при введении дозы МФК 2 мг/кг



массы животного произошло увеличение фракции ОП и более глубокие изменения в содержании продуктов ПОБ.

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.

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:  $ИИ = ВНСММ_{пл.} \times ОП_{пл.} + ВНСММ_{эр.} \times ОП_{эр.}$  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, указывая на наличие наиболее выраженного синдрома эндогенной интоксикации у самцов.

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 которых наблюдался синдром эндогенной интоксикации через 72 часа после введения МФК в дозе  $10^{-15}$  мг/кг массы животного.

На рис. 9 показаны значения коэффициента информативности применительно к дозозависимому эксперименту.

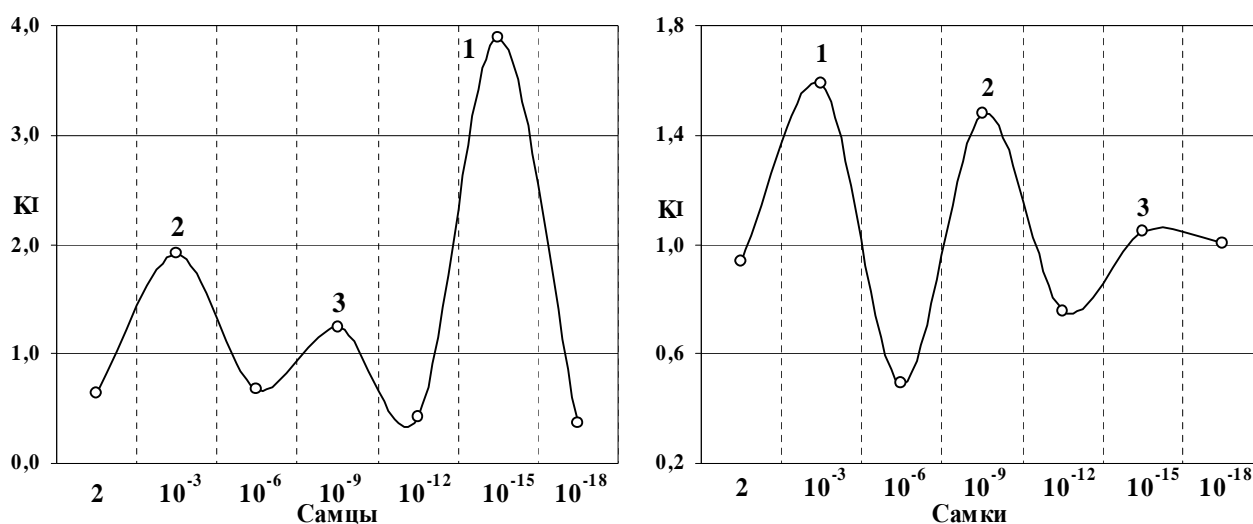


Рис. 9. Изменение коэффициента информативности биохимических показателей в зависимости от вводимых доз МФК группам самцов и самок лабораторных мышей. Примечание.  $K_I$  – значение рассчитанного коэффициента информативности, 1, 2, 3 – максимальные значения на графике в порядке уменьшения.

Расчет  $K_f$  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. 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.

Изучение ведения МФК в дозах  $10^{-3}$  и  $10^{-15}$  мг/кг массы животного самцам лабораторных мышей позволило предположить протекание адаптивных процессов. На рис. 10 показаны наибольшие изменения изучаемых биохимических показателей после введения доз МФК самцам мышей.

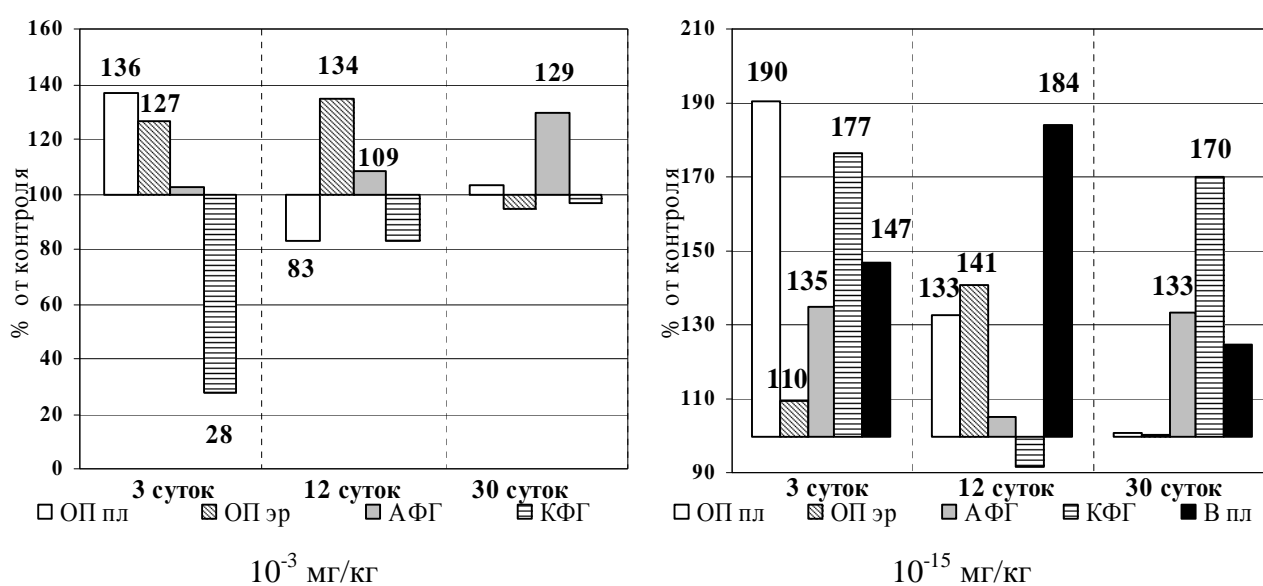


Рис. 10. Изменение содержания наиболее информативных биохимических показателей через 3, 12 и 30 суток после введения МФК самцам в дозах  $10^{-3}$ ,  $10^{-15}$  мг/кг массы животного в % относительно контрольных групп. Примечание: пл., эр., В – плазма, эритроциты, ВНСММ, соответственно. Указаны процентные отличия относительно контрольных групп при  $p \leq 0,05$ .

Через 6 суток после введения МФК в дозах  $10^{-3}$ ,  $10^{-15}$  мг/кг массы животного наблюдалось снижение ОП в плазме на 14%, 22%, соответственно; снижение ОП в эритроцитах в среднем на 8%. Только после введения МФК в дозе  $10^{-15}$  мг/кг спустя 6 суток мы отмечали рост ВНСММ в плазме на 44%, снижение ВНСММ в эритроцитах на 30%.

Через 12 суток после введения МФК в дозе  $10^{-15}$  мг/кг массы животного отмечено повышение ОП в плазме и эритроцитах на 33% и 41%, соответственно и ВНСММ в плазме на 84%. Отличия в содержании маркеров эндогенной интоксикации в крови опытных и контрольных групп мышей минимизировались к 30 суткам после введения МФК. Как в дозе  $10^{-3}$  мг/кг

массы животного, так и в дозе  $10^{-15}$  мг/кг было отмечено небольшое достоверное увеличение ВНСММ в эритроцитах в среднем по дозам на 15%.

Спустя 18 суток после введения МФК только в дозе  $10^{-3}$  мг/кг массы животного наблюдалось снижение ОП в плазме на 20%;  $10^{-15}$  мг/кг – увеличение ВНСММ в плазме на 36%. В дозе  $10^{-3}$  мг/кг, так и в дозе  $10^{-15}$  мг/кг нами был отмечен рост ОП в эритроцитах в среднем на 17%; рост АФГ и КФГ в среднем на 12%, 29%, соответственно.

Изучение содержания продуктов ПОБ, позволило обнаружить активацию процессов окислительной модификации белков через 30 суток после введения МФК в дозах  $10^{-3}$ ,  $10^{-15}$  мг/кг: концентрация АФГ увеличивалась в среднем на 30%, КФГ увеличивалась только при введении МФК в дозе  $10^{-15}$  мг/кг на 70%.

По изменению значений показателей было подтверждено более выраженное влияние МФК в дозе  $10^{-15}$  мг/кг. Факт увеличения продуктов ПОБ через 30 суток после инъекции раствора МФК, вероятно, свидетельствовал об особенностях процессов АОС или о срыве адаптивных механизмов.

## ВЫВОДЫ

1. 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.

2. 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.

3. 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 ПОБ, концентрация которых в крови остается повышенной.

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

### **РАБОТЫ, ОПУБЛИКОВАННЫЕ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Оценка экотоксичности специфических загрязняющих веществ по изменению биохимических показателей живых организмов / О.М. Плотникова, **А.М. Корепин**, И.В. Дуплякина, Н.Н. Матвеев // Теоретическая и прикладная экология. Киров, 2008. №4. С. 42-47.

2. Изучение содержания общего белка и альбуминов у лабораторных мышей при интоксикации метилфосфоновой кислотой / О.М. Плотникова, **А.М. Корепин** // Состояние окружающей среды и здоровье населения : Мат. II Всерос. науч.-практ. конф. Курган, 2009. С. 45-47.

3. Small rodents as bioindicators for the buffer zone at the objects of storage and destruction of chemical weapons (Мелкие грызуны как биоиндикаторы в зонах защитных мероприятий объектов уничтожения химического оружия) / О.М. Плотникова, И.В. Дуплякина, **А.М. Корепин**, Н.Н. Матвеев, Б.И. Кудрин, А.Н. Евдокимов // BIOINDICATORS 17 (17<sup>th</sup> International Conference on Environmental Bioindicators: Book of Abstract). Moscow : MSU, 2009.P. 81.

4. Изучение содержания общего белка и олигопептидов у лабораторных мышей при интоксикации метилфосфоновой кислотой / **А.М. Корепин**, О.М. Плотникова, С.Н. Лунева // Проблемы региональной экологии в условиях устойчивого развития : Мат. Всерос. науч.-практ. конф. Киров, 2009. Вып.7, ч. 2, С. 58-60.

5. **Корепин А.М.** Изменение общего белка и белковых фракций плазмы мелких грызунов при интоксикации метилфосфонатом // Молодежный научный потенциал в инновационном развитии Уральского региона : Материалы региональной конференции молодых ученых, посвященной году молодежи в России. Курган : изд-во Курганской ГСХА, 2009. С. 103-105.

6. Свободнорадикальное окисления белков и липидов и энергетический обмен у лабораторных мышей при воздействии метилфосфонатов как специфических поллютантов / О.М. Плотникова, **А.М. Корепин**, Н.Н. Матвеев, И.В. Дуплякина, С.Н. Лунева // Бюллетень

- Московского общества испытателей природы. Москва, 2009. Т. 114. Вып. 3. Ч. 3. С. 162-165.
7. Динамика содержания маркеров эндогенной интоксикации в крови при воздействии метилфосфоната на лабораторных мышей / **А.М. Корепин**, О.М. Плотникова // Экологобезопасные и ресурсосберегающие технологии и материалы : мат. рег. мол. науч.-практ. конф. с межд. уч. Улан-Удэ : Изд-во Бурятского ун-та, 2010. С. 91-93.
8. Биохимические показатели лабораторных мышей в зависимости от времени интоксикации метилфосфонатом / О.М. Плотникова, Н.Н. Матвеев, **А.М. Корепин**, И.В. Дуплякина // Теоретическая и прикладная экология. Киров, 2010. № 1. С. 81-86.
9. Влияние метилфосфоната на белковый обмен лабораторных мышей на примере адаптации самцов к разовому введению различных доз / **А.М. Корепин**, О.М. Плотникова // Биология будущего: традиции и инновации : мат. всерос. мол. науч. конф. с межд. уч. Екатеринбург : Изд-во УРГУ, 2010. С. 138-139.
10. Влияние различных концентраций метилфосфоновой кислоты на содержание основных маркеров развития эндогенной интоксикации у самцов белых лабораторных мышей / **А.М. Корепин**, С.Н. Лунева, О.М. Плотникова // Экология. Риск. Безопасность : мат. рег. науч.-практ. конф. Курган : Изд-во КГУ, 2010. Т. 2. С. 138-139.
11. К вопросу возможного влияния на мелких грызунов метилфосфонатов – особой группы веществ антропогенной природы / О.М. Плотникова, **А.М. Корепин**, Н.Н. Матвеев, И.В. Дуплякина // Антропогенная трансформация природной среды : мат. межд. конф. Пермь : Изд-во Пермского государственного университета, 2010. С. 133-140.
12. Динамика содержания общего белка и олигопептидов у лабораторных мышей при интоксикации метилфосфонатом / **А.М. Корепин**, О.М. Плотникова, С.Н. Лунева // Мат. XXI Съезда физиологического общества им. И.П. Павлова. Москва-Калуга : Типография ООО «БЭСТ-принт», 2010. С. 295.
13. Изучение содержания гликогена лабораторных мышей при введении метилфосфоновой кислоты / С.Н. Лунева, О.М. Плотникова, И.В. Савинова, Н.Н. Матвеев, **А.М. Корепин** // мат. науч.практ. конф. посвященной 200-летию со дня рождения Николая Ивановича Пирогова. Курган, 2010. С. 253-254.

14. Перекисное окисление белков и содержание маркеров эндогенной интоксикации при введении метилфосфоновой кислоты лабораторным мышам / С.Н. Лунева, О.М. Плотникова, **А.М. Корепин**, Н.Н. Матвеев, И.В. Савинова // мат. науч.практ. конф. посвященной 200-летию со дня рождения Николая Ивановича Пирогова. Курган, 2010. С. 254-256.

15. Влияние интоксикации метилфосфонатом на основные биохимические показатели метаболизма у лабораторных мышей / С.Н. Лунева, О.М. Плотникова, **А.М. Корепин**, Н.Н. Матвеев, И.В. Савинова // мат. науч.практ. конф. посвященной 200-летию со дня рождения Николая Ивановича Пирогова. Курган, 2010. С. 256-257.

16. Особенности влияния различных доз метилфосфоновой кислоты на основные биохимические показатели метаболизма лабораторных мышей / О.М. Плотникова, И.В. Савинова, Н.Н. Матвеев, **А.М. Корепин**, А.Н. Евдокимов, С.Н. Лунева // Вестник Челябинского государственного педагогического университета. Челябинск, 2011. №1. С. 325-334.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- АОС – антиоксидантная система;
- АФГ – альдегидфенилгидразоны, фракция продуктов ПОБ<sub>270нм</sub>;
- АХЭ – ацетилхолинэстераза;
- ВНСММ – вещества низкой и средней молекулярных масс;
- ИИ – индекс интоксикации;
- КП – фракция ВНСММ катаболического происхождения;
- КФГ – кетондинитрофенилгидразоны, фракция продуктов ПОБ<sub>363+370нм</sub>;
- МФК – метилфосфоновая кислота;
- ОБ – общий белок;
- ОМБ – окислительная модификация белков;
- ОП – фракция олигопептидов;
- ПОБ – перекисное окисление белков;
- РЦ СГЭКиМ – Региональный центр по обеспечению государственного экологического контроля и мониторинга объектов по хранению и уничтожению химического оружия по Курганской области;
- СЕЭ – сорбционная емкость эритроцитов;
- ФОВ – фосфорорганические отравляющие вещества;
- ФОС – фосфорорганические соединения;
- ФП – фосфорорганические пестициды;
- ХО – химическое оружие;
- ЭИ – эндогенная интоксикация.

КОРЕПИН АНТОН МИХАЙЛОВИЧ

Автореферат диссертации  
на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Подписано в печать 11.01.11

Формат 60x85/16 Объем 1,0 усл. печ. л. Тираж 100 экз.

Бумага офсетная. Печать оперативная. Заказ 130

Отпечатано в типографии «ДАММИ»

ИНН 4501144924 КПП 450101001

640028, г. Курган, пр. Машиностроителей, 13 «А»