

## СЕМЕЙСТВО БИОСЕНСОРНЫХ АНАЛИЗАТОРОВ ДЛЯ ОЦЕНКИ «ЭСТЕРАЗНОГО СТАТУСА» ОРГАНИЗМА

*Л.Г. Соколовская<sup>1</sup>, Л.В. Сиголаева<sup>1</sup>, А.В. Еременко<sup>1</sup>, И.Н. Курочкин<sup>1</sup>,  
Г.Ф. Махаева<sup>2</sup>, В.В. Малыгин<sup>2</sup>, И.Е. Зыкова<sup>3</sup>, В.И. Холстов<sup>1</sup>,  
Н.В. Завьялова<sup>1</sup>, С.Д. Варфоломеев<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

<sup>2</sup> Институт физиологически активных веществ РАН,  
Московская обл., г. Черноголовка

<sup>3</sup> Центр медико-биологических и экологических проблем РАЕН, Москва

Ферменты из группы эстераз являются биохимическими маркерами ряда функциональных нарушений организма, в том числе вызванных контактом с токсичными фосфорорганическими соединениями (ФОС) и карбаматами. Соотношение уровней их активности определяет «эстеразный статус» организма – важный показатель в нейробиологии, токсикологии и фармакологии. Разработанные автоматические амперометрические биосенсорные анализаторы были использованы для определения ключевых эстераз крови: ацетилхолинэстеразы (АХЭ), бутирилхолинэстеразы (БХЭ), карбоксилэстераз (КЭ) и нейротоксичной эстеразы (НТЭ). Их пределы обнаружения составили 0,03, 0,03, 0,04 и 0,8 mU, соответственно, что значительно ниже значений, получаемых при использовании спектрофотометрического метода. Разработанные электрохимические подходы для оценки «эстеразного статуса» были продемонстрированы на исследовании образцов крови персонала специальных химических объектов, многократно контактировавшего с антихолинэстеразными агентами, в сравнении с «контрольной группой» здоровых людей. Показана статистически достоверная разница в средних уровнях активности АХЭ и КЭ: контрольная группа характеризуется повышенным уровнем активности АХЭ, в то время как средний уровень КЭ в данной группе значительно ниже. Для достоверной медико-экологической диагностики предложен более устойчивый параметр – соотношение активностей эстераз в цельной крови и ее фракциях.

Enzymes from esterase family are biochemical markers of a number of organism dysfunctions including effects induced by toxic organophosphorus compounds (OP) and carbamates. Esterase activity levels ratio defines the "Esterase Status" of organism which is important neurobiological, toxicological and pharmacological factor. Automatic amperometric biosensor analyzers developed were utilized for the main blood esterases analysis. The detection limits of acetylcholinesterase (AChE), butyrylcholinesterase (BuChE), carboxylesterases (CE) and neurotoxic esterase (NTE) in blood were 0,03, 0,03, 0,04 and 0,8 mU, respectively, which are much lower than if spectrophotometry is used. Electrochemical approaches to "Esterase Status" estimation were shown by examination of with blood samples of special chemical establishments' stuff contacted with anticholinesterases in comparison with control group of healthy people. Statistically valid difference between AChE and CE mean activity values was demonstrated. AChE level in the control group is higher whereas CE activity is much lower. An esterase activity ratio in whole blood and its fractions as more robust factor for medical-ecological diagnostics, allowing to take the individual organism characteristics into account, was proposed.

### Введение

Уровень активности ряда ферментов из группы эстераз, в которую входят ацетилхолинэстераза (ЕС 3.1.1.7), бутирилхолинэстераза (ЕС 3.1.1.8), карбоксилэстеразы (ЕС 3.1.1.1) и нейротоксичная эстераза (систематический номер отсутствует), является исключительно важ-

ным показателем в нейробиологии, токсикологии и фармакологии. Перечисленные ферменты являются биохимическими маркерами ряда функциональных нарушений организма, в том числе вызванных контактом с токсичными фосфорорганическими соединениями (ФОС) и карбаматами [1, 2].

Интерес к определению активности данной группы эстераз в крови человека возрос в последнее время в связи с показанными корреляциями между изменением их активности и развитием некоторых широко распространенных заболеваний, в частности, болезнью сердечно-сосудистой системы [3–6], атеросклероза [7], болезнью Паркинсона и Альцгеймера [3, 8] и др. Для клинических исследований, ранней диагностики и мониторинга целого ряда таких нарушений необходимо знать спектр активностей ферментов данной группы или так называемый «эстеразный статус» организма. «Эстеразный статус» определяет индивидуальную реакцию организма при контакте с ФОС или карбаматами, поэтому он может оказаться полезным при отборе персонала, в частности для работы на предприятиях по уничтожению химического оружия. Определение «эстеразного статуса» конкретного больного, безусловно, необходимо при выборе стратегии лечения острых и отсроченных отравлений и иных патологий. Особый интерес представляет использование «эстеразного статуса» для ретроспективной оценки степени воздействия ФОС и других токсикантов на организм человека.

В настоящей работе рассмотрены возможности разработанных в нашей лаборатории автоматических биосенсорных анализаторов для определения активности упомянутых выше ключевых эстераз крови, формирующих понятие «эстеразный статус» организма.

Рассмотрим особенности изменения активности ключевых эстераз при различных патологиях организма и токсических воздействиях.

### Ацетилхолинэстераза

Ацетилхолинэстераза (АХЭ) млекопитающих помимо центральной нервной системы находится также и в периферических тканях, таких как симпатические и парасимпатические ганглии, парасимпатические окончания органов, моторные окончания двигательных нейронов, потовые железы. В крови АХЭ представлена, в основном, в мембранах эритроцитов. Кроме того, в зависимости от видовой принадлежности,

разные ее количества могут содержаться в плазме. Плазма крыс, например, может содержать 30–50% АХЭ, тогда как у человека этот уровень значительно ниже. Биологическая роль АХЭ связана с регуляцией холинергической нейротрансмиссии путем гидролиза ацетилхолина в межсинаптическом пространстве.

В последнее время большое внимание стало уделяться физиологическим функциям АХЭ, не связанным с холинергической трансмиссией [9, 10]. Была показана роль ацетилхолинэстеразы, а также бутирилхолинэстеразы, в качестве стимулятора пролиферации в процессах развития. Ацетилхолинэстераза может быть маркером ранней дифференцировки, а бутирилхолинэстераза, возможно, вовлечена в процессы клеточной миграции. Кроме того, была показана связь между активностью обоих ферментов и клеточным ростом в некоторых опухолях мозга [9].

### Бутирилхолинэстераза

Бутирилхолинэстераза (БХЭ) содержится в различных тканях млекопитающих: в печени, сердце, эндотелии сосудов, нервной системе и плазме крови. В настоящее время существует множество гипотез, описывающих возможную биологическую роль этого фермента в развивающихся и зрелых организмах. Было показано, что БХЭ играет ключевую роль в нейрогенезе [11]. Во взрослых организмах при их отравлении малыми дозами ФОС или карбаматов БХЭ, предположительно, выполняет защитную функцию [9], связывая часть попавшего в организм токсиканта, тем самым, снижая его острую токсичность. БХЭ участвует в процессах метаболизма широкого спектра эндогенных и экзогенных субстратов и биотрансформации ксенобиотиков. Так, основным метаболическим путем выведения кокаина из организма человека является его гидролиз под действием БХЭ [12]. Неактивные предшественники многих лекарственных препаратов переходят в активную форму в процессе метаболической активации посредством их гидролиза в присутствии БХЭ. Этот эффект был показан на противоопухолевом агенте

иринотекане [13], противоастматическом препарате бамбутероле [14], серии защитных средств от воздействия радиации – О-ацильных производных серотонина [15] и др.

БХЭ плазмы крови человека помимо обычной формы (U) имеет около 9 фенотипических изоформ, существование которых является результатом различных генных мутаций [16]. Точное число изоформ БХЭ не установлено, так как нет доказательств того, что вновь описанные формы не совпадают с известными ранее. К настоящему времени описано порядка 20 фенотипов, но только 10 из них могут быть четко идентифицированы с использованием стандартных биохимических методов. К ним относятся «атипичные» (A), «молчащие» (S), фторидрезистентные (F), а также K (Kalow) и J (James) – гомо- и гетерозиготные варианты БХЭ [17]. Качественно их разделяют по отношению к ингибированию в присутствии фторид-ионов, дибукаина (в медицине используется в качестве местного анестезирующего средства) и (2-гидрокси-5-фенилбензил)-триметиламмоний бромида (Ro-02-0683) [16–18]. Наиболее важной с клинической точки зрения является атипичная изоформа БХЭ. Люди с подобным генотипом характеризуются аномальной реакцией на введение короткодействующего мышечного релаксанта сукцинилдихолина, что выражается в 2–5-часовом апноэ и продолжительном параличе [19]. Кроме того, они более восприимчивы к воздействию антихолинэстеразных препаратов, в том числе токсичных ФОС, что обуславливает большую степень риска развития у них острых или отставленных нейротоксических эффектов при контакте с подобными соединениями.

Таким образом, терапевтический эффект многих лекарственных средств зависит от уровня бутирилхолинэстеразной активности организма. Использование каждого конкретного препарата и его дозировка должны носить строго индивидуальный характер. Поэтому при лечении с использованием медикаментов на основе эфиров карбоновых кислот, а также при первом контакте человека с антихолинэстеразным препаратом, необходимо знать уровень бутирилхолинэстеразной активности организма, что

может предотвратить возникновение нежелательных, часто необратимых и опасных для жизни последствий для организма.

### Карбоксилэстеразы

Карбоксилэстеразы (КЭ) млекопитающих представляют собой большую группу ферментов, локализованных в эндоплазматическом ретикулуме и цитозоле клеток многих тканей. Максимальная карбоксилэстеразная активность была найдена в микросомах печени. Достаточно высокая активность характерна для плазмы. Также КЭ содержатся в тонком и толстом кишечнике, желудке, мозге, моноцитах и макрофагах [20]. Данная группа ферментов катализирует гидролиз липофильных эфир-, тиоэфир- и амидсодержащих субстратов [21, 22]. Широкая субстратная специфичность КЭ определяет возможность клетки метаболизировать целый спектр разнообразных эфирных соединений. Они участвуют в процессах детоксикации и метаболической активации различных медицинских препаратов, природных токсикантов и канцерогенов. Существенное число экзогенных веществ являются субстратами КЭ. В их число входят кокаин, капсаицин, пальмитоил-соА, галоперидол, имидаприл, салицилаты, стероиды и др. [23–27].

На карбоксилэстеразную активность оказывают влияние как прямое воздействие некоторых соединений, таких как антихолинэстеразные агенты (бис-*n*-нитрофенилфосфат), так и уровень ферментативной регуляции. Активность микросомальных КЭ, как и других ксенобиотикметаболизирующих ферментов, может индуцироваться введением таких препаратов как фенобарбитал, арокрол, полициклические ароматические гидрокарбонаты, аминопирин и др. [23, 28].

КЭ являются одними из ключевых ферментов, участвующих в детоксикации ФОС и защите организма от их токсического действия. Было показано, что КЭ способны гидролизовать карбоксильные связи некоторых ФОС, например малатиона [29–31], переводя их в неактивное состояние. Второй механизм защиты организма от воздействия ФОС обусловлен связыванием

токсиканта в активном центре фермента – фосфорилированием КЭ, что ведет к снижению концентрации ФОС в крови и, следовательно, к меньшей степени ингибирования АХЭ в органах-мишенях, например, мозге [29]. Быстрая спонтанная реактивация фосфорилированных КЭ в плазме приводит к трансформации ФОС в его неактивный и нетоксичный метаболит [32].

Таким образом, токсичность и терапевтический эффект целого спектра соединений зависит от активности КЭ организма, так как они являются или эффекторами ферментов данного класса, или метаболизируются ими.

### Нейротоксичная эстераза

Как уже было сказано, острая токсичность ФОС связана с их способностью эффективно ингибировать ключевой фермент нервной системы – АХЭ в синапсах. Этот процесс в настоящее время хорошо изучен, клиническая картина острых отравлений достаточно ясна и диагноз обычно не вызывает сомнений. Помимо острого токсического действия многие ФОС обладают способностью индуцировать так называемую отставленную нейротоксичность ФОС (ОНТФОС) [33, 34] – дистальные полинейропатии, проявляющиеся через 7–14 дней после воздействия токсиканта.

Рядом исследований было показано, что мишенью действия ФОС, вызывающих эффект отставленной нейротоксичности, является нейротоксичная эстераза (НТЭ). Корреляция, обнаруженная у модельных животных (кур) между значительным ингибированием НТЭ головного мозга в течение нескольких часов после отравления (пороговая степень ингибирования НТЭ – 70–80%) и развитием спустя 1–3 недели отставленной нейропатии, позволяет использовать НТЭ в качестве биомаркера ОНТФОС [35–37]. Отдельно было показано, что в первые часы после введения модельных ФОС экспериментальным животным (курам) параллельно с ингибированием НТЭ головного мозга наблюдается ингибирование НТЭ циркулирующих лимфоцитов и тромбоцитов [38, 39], а также цельной крови [40–42]. Это позволяет говорить о возможности использования НТЭ крови в качестве

биохимического маркера отставленной нейропатии.

Таким образом, в настоящий момент времени каждая их перечисленных эстераз изучена более или менее полно. Однако практически не предпринимаются попытки одновременно измерять и тем более анализировать соотношения активностей более чем двух ферментов (как правило, в комбинации АХЭ/БХЭ или АХЭ/НТЭ).

### Материалы и методы

В работе использовались следующие реактивы: ацетилхолин хлорид, бутирилхолин хлорид, параоксон (*O,O*-диэтил-4-нитрофенилфосфат) фирмы Sigma (Германия), фенол фирмы Merck (Германия), эзеринсульфат (физостигмин) фирмы Calbiochem (США), мипафокс (*N,N'*-диизопропиламинофторфосфат) и фенилвалерат фирмы Oryza Laboratory Inc. (США). *n*-Нитрофенилацетат синтезирован и охарактеризован в Институте физиологически активных веществ РАН. Набор для определения белка по кумасси фирмы Sigma (США). Все остальные реактивы, соли и компоненты буферных растворов были марки не ниже «хч» и использовались без предварительной очистки. Все водные растворы готовились с использованием воды, очищенной системой очистки воды MilliQ (США).

Образцы венозной крови каждого пациента фракционировали на форменные элементы и плазму, после чего каждую фракцию замораживали отдельно и хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$  до момента использования. Непосредственно перед началом работы размороженные образцы плазмы разбавляли 50 мМ Трис-НСl, 0,2 мМ ЭДТА, рН 8,0 в 10 раз. Клеточные препараты разбавлялись тем же буфером в зависимости от необходимости в 10 или 50 раз.

Анализ ацетилхолинэстеразной активности в препаратах форменных элементов крови человека и бутирилхолинэстеразной активности в препаратах плазмы крови проводили с использованием сконструированного в нашей лаборатории автоматического электрохимического анализатора, снабженного холинчувствитель-

ным элементом. Для этого в лунки 12-луночного стрипа вносили по 20 мкл образцов форменных элементов крови, разбавленных в 10 раз. Далее стрип помещали в анализатор и стартовали реакцию добавлением 310 мкл  $1,07 \times 10^{-3}$  М раствора ацетилхолина в 50 мМ Хепес, 30 мМ КСl, 3 мМ ЭДТА, рН 7,5. Концентрацию накопившегося за 10 мин холина в образцах определяли электрохимически в автоматическом режиме работы анализатора, используя для расчетов калибровочную зависимость по холину, полученную в тех же условиях. Каждое измерение повторяли дважды. Для определения скорости спонтанного гидролиза ацетилхолина проводили аналогичный эксперимент в отсутствие препаратов форменных элементов крови.

Анализ бутирилхолинэстеразной активности проб проводили аналогично, используя препараты плазмы, разбавленные в 10 раз. Реакцию стартовали добавлением 310 мкл  $2,9 \times 10^{-3}$  М раствора бутирилхолина в 50 мМ Хепес, 30 мМ КСl, 3 мМ ЭДТА, рН 7,5. Далее, как описано выше.

Активность НТЭ определяли дифференциальным методом Джонсона [43] с небольшими модификациями. Образцы крови, содержащие НТЭ, разбавляли в 20 раз 50 мМ Трис-НСl, 0,2 мМ ЭДТА, рН 8,0 и каждый препарат инкубировали 20 мин при 37°C с 50 мкМ параоксоном (Образец В) или с 50 мкМ параоксоном и 250 мкМ мипафоксом (Образец С). Далее ко всем образцам добавляли фенолвалерат (приготовленный из 15 мг/мл запасного раствора в этаноле разбавлением в 30 раз водным раствором Тритона X-100) до конечной концентрации 0,68 мМ и инкубировали при 37°C еще 30 мин. Затем ферментативную реакцию останавливали добавлением 10%-ного водного раствора SDS. После добавления SDS образцы разбавляли в 20 раз 0,05 М Na-фосфатным буфером с 0,1 М NaCl рН 7,0. Фенол, выделившийся в результате ферментативной реакции, определяли электрохимически при помощи тирозиназного электрода [38], подсоединенного к проточной электрохимической ячейке, снабженной комбинированным Pt-Ag/AgCl электродом. Пробы вводились в проток (0,05 М Na-фосфатный буфер с 0,1 М

NaCl, рН 7,0) через инжектор с 50 мкл петлей. Все измерения проводили при -150 мВ относительно Ag/AgCl референсного электрода при помощи управляемого компьютером потенциостат-гальваностата (ИФХ РАН). Каждое измерение повторяли трижды. Концентрация фенола определялась по калибровочной зависимости, полученной в тех же условиях. Активность НТЭ рассчитывали как разность фенолвалерат-гидролизующей активности в пробах В и С.

Анализ карбоксилэстеразной активности препаратов плазмы, сыворотки и клеток крови человека проводили спектрофотометрически на основе реакции ферментативного гидролиза *n*-нитрофенилацетата с образованием продукта желтого цвета (*n*-нитрофенола), накопление которого измеряли при длине волны 405 нм. Для этого в каждую лунку 96-луночного планшета раскапывали по 20 мкл образцов форменных элементов, разбавленных в 50 раз, или плазмы, разбавленной в 10 раз. Далее во все лунки добавляли по 156 мкл Na-фосфатного буфера (рН 8,0) и 20 мкл  $10^{-4}$  М раствора эзерина (готовили перед раскапыванием из 10 мМ водного раствора). Пробы инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре для ингибирования АХЭ и БХЭ. После чего ко всем пробам добавляли по 4 мкл 50 мМ раствора *n*-нитрофенилацетата в этиловом спирте. Прирост оптической плотности измеряли в течение 3 мин в кинетическом режиме на мультискане Anthos ht2 при 405 нм. Для определения скорости спонтанного гидролиза *n*-нитрофенилацетата проводили аналогичный эксперимент в отсутствие препаратов плазмы или клеток. Каждое измерение делалось в 3-4 повторях.

Белок в образцах определяли по кумасси, используя бычий сывороточный альбумин в качестве стандарта.

#### **Биосенсорные анализаторы для оценки «эстеразного статуса» организма**

Современные методы определения активности эстераз крови основаны на использовании спектрофотометрических методов и применении селективных субстратов и ингибиторов соответствующих эстераз. Недостаточная чувст-

**Таблица 1.** Аналитические характеристики биосенсоров  
для определения активности эстераз крови

Тип биосенсора	Принцип измерения	Линейный диапазон концентраций	Предел детекции	Стабильность мембраны
Биосенсор на холин	<p align="center">Холиноксидаза</p> $\text{Холин} + 2\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{Pt (+600 мВ)}} \text{Бетаин} + 2\text{H}_2\text{O}_2 \quad (1)$ $\text{H}_2\text{O}_2 \xrightarrow{\text{Pt (+600 мВ)}} \text{O}_2 + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \quad (2)$	10–400 мкМ по холину	10 мкМ холина	14 дней или 1000 измерений
Биосенсор на фенол	<p align="center">Тирозиназа</p> $\text{Фенол} + \text{O}_2 \xrightarrow{\text{Тирозиназа}} \text{Пирокатехин} \quad (1)$ <p align="center">Тирозиназа</p> $\text{Пирокатехин} + \text{O}_2 \xrightarrow{\text{Тирозиназа}} \text{Хинон} \quad (2)$ <p align="center">Графит/Мед. (–150 мВ)</p> $\text{Хинон} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \xrightarrow{\text{Графит/Мед. (–150 мВ)}} \text{Пирокатехин} \quad (3)$	0,025–10 мкМ по фенолу	0,025 мкМ	20 дней
Биосенсор на этиловый спирт	<p align="center">Алкогольоксидаза</p> $\text{Этанол} + \text{O}_2 \xrightarrow{\text{Алкогольоксидаза}} \text{Уксусный альдегид} + \text{H}_2\text{O}_2 \quad (1)$ <p align="center">Pt (+600 мВ)</p> $\text{H}_2\text{O}_2 \xrightarrow{\text{Pt (+600 мВ)}} \text{O}_2 + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \quad (2)$	18–720 мкМ	18 мкМ	–

вительность и высокая трудоемкость этих подходов в значительной степени сдерживают использование принципа определения индивидуальной чувствительности организма на основе исследования его «эстеразного статуса». Существенное повышение чувствительности определения эстераз крови и заметное упрощение всей процедуры анализа может быть достигнуто при использовании электрохимических биосенсорных анализаторов.

За последние 10 лет в нашей лаборатории разработано семейство электрохимических приборов, позволяющих проводить измерение активности эстераз с использованием разного типа субстратов. Помимо этого для каждого типа анализа могут быть использованы специально разработанные стрипы с разнесенным по лункам набором сухих реагентов (субстратов, ингибиторов, стоп-растворов и т. п.), что позволяет значительно упростить всю процедуру анализа и сократить его время.

Метод определения активности АХЭ и БХЭ основан на электрохимической детекции холина, выделяющегося в результате ферментативного гидролиза ацетилхолина в присутствии АХЭ или бутирилхолина в присутствии БХЭ:

**АХЭ**

Ацетилхолин  $\longrightarrow$  Холин + Уксусная кислота

**БХЭ**

Бутирилхолин  $\longrightarrow$  Холин + Масляная кислота

Определение активности НТЭ построено на высокочувствительной биосенсорной детекции фенола, выделяющегося в результате фермента-

тивного гидролиза фенолвалерата, протекающего под действием НТЭ:

**НТЭ**

Фенилвалерат  $\longrightarrow$  Фенол + Валерьяновая кислота

Анализ активности карбоксилэстераз может быть осуществлен по гидролизу типичных спиртовых субстратов КЭ (этилбутирата, этилацетата) и детекции выделяющегося этанола при помощи биосенсора на этиловый спирт:

**КЭ**

Этилбутират (Этилацетат)  $\longrightarrow$  Этиловый спирт + Масляная (Уксусная) кислота

Основу всех биосенсорных анализаторов составляют сенсорные мембраны и электроды, содержащие соответствующие оксидо-редуктазы. В табл. 1 приведены основные аналитические и эксплуатационные характеристики разработанных сенсорных мембран и электродов для определения продуктов ферментативного гидролиза основных субстратов эстераз (холина, фенола и этилового спирта).

В табл. 2 приведены значения пределов обнаружения ключевых эстераз крови для разработанных нами биосенсорных методов, а также для традиционно используемых спектрофотометрических методов анализа. Из приведенных данных следует, что биосенсорные методы анализа обеспечивают более низкие пределы обнаружения эстераз в образцах. В отношении НТЭ следует особо отметить, что именно благодаря исключительно высокой чувствительности фенольного биосенсора удалось достичь существенно более низкого предела обнаружения НТЭ.

Благодаря этому стало возможным измерять активность НТЭ непосредственно в цельной крови, что впервые позволило включить этот фермент в понятие «эстеразный статус» человека. Данные факты, а также возможность высокой степени автоматизации процесса измерения и сведения к минимуму усилий оператора, позволяют предложить биосенсорные методы ана-

**Таблица 2.** Пределы обнаружения эстераз различными методами анализа

Фермент	Электрохимические методы	Спектрофотометрические методы
АХЭ, БХЭ	0,03 mU (по ацетилхолину/ бутирилхолину)	0,25 mU (по ацетилтиохолину/ бутирилтиохолину)
НТЭ	0,8 mU (по фенилвалерату)	30 mU (по фенилвалерату)
КЭ	0,04 mU (по этилбутирату)	0,2 mU (по <i>n</i> -нитрофенилацетату)

Таблица 3. Активности эстераз крови обследованного персонала<sup>1)</sup>

Номер пробы	АХЭ, форм. элем.	БХЭ, плазма	НТЭ, форм. элем.	КЭ, плазма	КЭ, форм. элем.	
Персонал СХО	55	8,4±0,3	60,0±7,0	0,20±0,04	9,3±0,5	5,1±0,7
	56	– <sup>2)</sup>	33,0±6,0	0,13±0,02	11,0±1,7	5,2±0,3
	57	– <sup>2)</sup>	3,8±1,9	0,24±0,01	7,9±0,6	4,6±0,8
	58	– <sup>2)</sup>	3,1±1,3	0,16±0,01	10,2±0,6	4,5±0,3
	59	– <sup>2)</sup>	30,8±0,9	0,13±0,01	9,5±0,2	4,3±1,0
	61	21,9±0,1	76,0±4,0	0,18±0,01	15,6±1,0	7,8±0,5
	64	22,4±0,6	84,0±5,0	0,06±0,01	16,7±0,7	7,5±0,3
	66	19,3±0,6	68,0±1,1	0,06±0,01	14,5±0,3	5,7±0,1
	67	17,0±0,2	58,0±1,4	0,06±0,01	16,3±0,6	5,7±0,2
	69	19,2±0,4	43,0±2,0	0,10±0,01	12,6±0,5	6,4±0,3
	$\bar{x}\pm SD$	<b>18±5</b>	<b>46±27</b>	<b>0,13±0,06</b>	<b>12±3</b>	<b>5,7±1,2</b>
Контрольная группа	131	7,6±0,3	22,2±0,6	0,05±0,01	3,9±0,1	6,5±0,8
	136	28,0±0,1	4,4±0,1	0,23±0,04	4,3±0,3	6,7±0,4
	152	31,1±0,8	4,9±0,1	0,30±0,04	4,5±0,5	5,4±0,1
	155	29,8±0,5	29,3±0,2	0,28±0,02	5,8±0,3	7,1±0,3
	156	26,5±0,2	31,6±0,6	0,36±0,01	5,7±0,2	4,5±0,3
	135	41,4±1,1	58,0±2,1	0,17±0,02	7,5±0,1	6,6±0,7
	144	35,9±0,7	54,1±1,8	0,15±0,02	6,5±0,5	6,3±0,4
	147	30,9±0,4	52,6±6,9	0,14±0,01	6,8±0,3	6,3±0,2
	158	30,0±1,7	60,3±0,4	0,10±0,02	7,0±0,2	6,1±0,4
	162	35,2±1,5	48,3±0,4	0,07±0,01	7,4±0,4	6,7±0,3
	$\bar{x}\pm SD$	<b>30±8</b>	<b>37±20</b>	<b>0,19±0,10</b>	<b>5,9±1,3</b>	<b>6,2±0,7</b>
<b>Достоверное различие</b>	+	–	–	+	–	

<sup>1)</sup> в нмоль/мин·мг белка<sup>2)</sup> не определено

лиза в качестве базовых методов для оперативной оценки «эстеразного статуса» организма.

Возможности электрохимических подходов были продемонстрированы на примере анализа «эстеразного статуса» персонала, многократно контактировавшего с антихолинэстеразными агентами в ходе своей профессиональной деятельности (персонал специальных химических объектов (СХО)). В качестве контроля использовалась кровь здоровых людей, не контактировавших ранее с антихолинэстеразными агентами (контрольная группа).

Локализация ферментов крови, определяющих «эстеразный статус» человека, а также перекрестная субстратная специфичность приводят к необходимости фракционирования крови для независимого определения каждого из четырех параметров. В качестве наиболее простого метода фракционирования было проведено разделение препаратов цельной крови каждого пациента на форменные элементы (клетки) и плазму.

Используя описанные методы, были измерены активности эстераз в препаратах крови 20



**Таблица 4.** Соотношения активностей эстераз крови обследованного персонала

Номер пробы	АХЭ/БХЭ	АХЭ/НТЭ	АХЭ/КЭ <sub>пл.</sub>	АХЭ/КЭ <sub>ф.эл.</sub>	БХЭ/НТЭ	БХЭ/КЭ <sub>пл.</sub>	БХЭ/КЭ <sub>ф.эл.</sub>	НТЭ/КЭ <sub>пл.</sub>	НТЭ/КЭ <sub>ф.эл.</sub>	КЭ <sub>пл.</sub> /КЭ <sub>ф.эл.</sub>	
Персонал СХО	55	0,14	41	0,90	1,65	294	6,45	11,76	0,022	0,040	1,82
	56	–	–	–	–	246	3,00	6,35	0,012	0,026	2,12
	57	–	–	–	–	16	0,48	0,83	0,030	0,052	1,72
	58	–	–	–	–	20	0,30	0,69	0,015	0,035	2,27
	59	–	–	–	–	237	3,24	7,16	0,014	0,030	2,21
	61	0,29	121	1,46	2,81	420	5,07	9,74	0,012	0,023	1,92
	64	0,27	386	1,34	2,99	1448	5,03	11,20	0,003	0,008	2,23
	66	0,28	316	1,33	3,39	1114	4,69	11,93	0,004	0,011	2,54
	67	0,29	279	1,04	2,98	951	3,56	10,18	0,004	0,011	2,86
	69	0,45	200	1,52	3,00	448	3,41	6,72	0,008	0,015	1,97
$\bar{x} \pm SD$	<b>0,29±0,09</b>	<b>220±120</b>	<b>1,27±0,22</b>	<b>2,80±0,54</b>	<b>520±460</b>	<b>3,52±1,86</b>	<b>7,66±3,95</b>	<b>0,012±0,008</b>	<b>0,025±0,014</b>	<b>2,17±0,33</b>	
Контрольная группа	131	0,34	158	1,95	1,17	462	5,68	3,43	0,012	0,007	0,60
	136	6,32	120	6,58	4,19	19	1,04	0,66	0,055	0,035	0,64
	152	6,34	103	6,99	5,72	16	1,10	0,90	0,068	0,056	0,82
	155	1,01	108	5,15	4,20	107	5,07	4,14	0,048	0,039	0,82
	156	0,84	73	4,62	5,91	88	5,52	7,06	0,063	0,081	1,28
	135	0,71	246	5,52	6,27	345	7,73	8,79	0,022	0,025	1,14
	144	0,66	236	5,52	5,70	356	8,32	8,59	0,023	0,024	1,03
	147	0,59	224	4,54	4,90	381	7,74	8,35	0,020	0,022	1,08
	158	0,50	294	4,29	4,92	591	8,61	9,89	0,015	0,017	1,15
	162	0,73	525	4,76	5,25	721	6,53	7,21	0,009	0,010	1,10
$\bar{x} \pm SD$	<b>1,80±2,26</b>	<b>210±130</b>	<b>4,99±1,31</b>	<b>4,82±1,39</b>	<b>310±230</b>	<b>5,73±2,60</b>	<b>5,90±3,20</b>	<b>0,034±0,021</b>	<b>0,032±0,021</b>	<b>0,97±0,22</b>	
Достоверное различие	+	–	+	+	–	+	–	+	–	+	

пациентов (в 10 препаратах крови лиц, контактировавших ранее с ингибиторами АХЭ, и в 10 препаратах крови контрольной группы людей). Данные сведены в табл. 3. Статистический анализ данных на основании t-критерия показывает, что наблюдается статистически достоверная разница в средних уровнях активности АХЭ и КЭ плазмы у контрольной группы и персонала СХО. Контрольная группа характеризуется несколько более высоким уровнем активности АХЭ, в то время как средний уровень КЭ у данной группы лиц значительно ниже. В то же время не обнаружено значимых различий в уровнях активностей других ферментов (БХЭ, НТЭ и КЭ форменных элементов) в этих двух группах людей.

Более устойчивым параметром, позволяющим учесть индивидуальные особенности каждого организма, является соотношение эстераз в крови (табл. 4). При таком сравнении появляется возможность говорить о большем числе параметров, для которых наблюдается достоверная разница между персоналом СХО и контрольной группой. В эти соотношения входят: АХЭ/БХЭ (1); АХЭ/КЭ<sub>пл.</sub> (2); АХЭ/КЭ<sub>ф.эл.</sub> (3); БХЭ/КЭ<sub>пл.</sub> (4); НТЭ/КЭ<sub>пл.</sub> (5) и КЭ<sub>пл.</sub>/КЭ<sub>ф.эл.</sub> (6).

Таким образом, использование семейства описанных электрохимических анализаторов значительно расширяет возможности одновременного определения активностей нескольких эстераз крови, что может быть использовано для организации оперативного медико-экологического мониторинга здоровья населения. Полученные предварительные данные указывают на то, что «эстеразный профиль» человека может быть информативным диагностическим показателем контакта данного человека с «антихолинэстеразами». Очевидно, что для окончательных выводов необходимо расширить как объем анализируемых данных, так и число анализируемых эстераз, а также дополнительно учитывать историю болезни каждого из обследованных пациентов.

### Литература

1. Noort D., Benschop H.P., Black R.M. Toxicol. and Appl. Pharmacol. 2002. 184, p. 116–126.
2. Costa G.C. Environ. Health Perspect. 1996. 104, Suppl. 1, p. 55–67.
3. Billecke S., Draganov D., Counsell R., et al. Drug Metab. and Disposit. 2000. 28, № 11, p. 1355–1342.
4. La Du B.N., Billecke S., Hsu C., et al. Drug Metab. and Disposit. 2001. 4, № 11, p. 566–569.
5. Antikainen M., Murtomäki S., Syväne M., et al. J. Clin. Invest. 1996. 98, № 4, p. 883–885.
6. Blatter Garin M.-C., James R.W., Dussoix Ph., et al. J. Clin. Invest. 1997. 99, № 1, p. 62–66.
7. Nicholls D.P., Maxwell A.P., Hasselwander O., et al. Atherosclerosis. 1997. 134, № 1–2, p. 212.
8. Yamamoto M., Kondo I. Brain Res. 1998. 806, p. 271–273.
9. Barbosa M., Rios O., Velásquez M., et al. Surg. Neurol. 2001. 55, p. 106–112.
10. Small D.H., Michaelson S., Sberna G. Neurochem. Int. 1996. 28, p. 453–483.
11. Mack A., Robitzki A. Progr. Neurobiol. 2000. 60, № 6, p. 607–628.
12. Zhan C.G., Zheng F., Landry D.W. J. Amer. Chem. Soc. 2003. 125, № 9, p. 2462–2474.
13. Guemei A.A., Cottrell J., Band R., et al. Cancer Chemother. and Pharmacol. 2001. 47, p. 283–290.
14. Tunek A., Hjertberg E., Mogensen J.V. Biochem. Pharmacol. 1991. 41, № 3, p. 345–348.
15. Makhaeva G.F., Suvorov N.N., Ginodman L.M., Antonov V.K. Bioorg. Chem. 1977. 3, p. 1384–1399.
16. Simeon-Rudolf V., Reiner E., Evans R.T., et al. Chem.-Biol. Interact. 1999. 119–120, p. 165–171.
17. Simeon-Rudolf V., Kovarik Z., Škrinjaric-Špoljar M., Evans R.T. Chem.-Biol. Interact. 1999. 119–120, p. 159–164.
18. Satoh T., Hosokawa M. Toxicol. Lett. 1995. 82/83, p. 447–452.
19. Pirmohamed M., Park K. Trends Pharmacol. Sci. 2001. 22, № 6, p. 298–305.
20. Saton T., Hosokawa M. Toxicol. Lett. 1995. 82/83, p. 439–445.
21. Xie M., Yang F., Liu L., et al. Drug Metab. and Disposit. 2002. 30, № 5, p. 541–547.
22. Saboori A.M., Newcombe D.S. J. Biol. Chem. 1990. 265, № 32, p. 19792–19799.
23. McRee D. Chem. Biol. 2003. 10, p. 295–297.
24. Brzezinski M.R., Spink B.J., Dean R.A., et al. Drug Metab. and Disposit. 1997. 25, p. 1089–1096.
25. Park Y.H., Lee S.S. Biochem. and Mol. Biol. Int. 1994. 34, p. 351–360.
26. Nambu K., Miyazaki H., Nakanishi Y., et al. Biochem. Pharmacol. 1987. 36, p. 1715–1722.
27. Takai S., Matsuda A., Usami Y., et al. Biol. and Pharm. Bull. 1997. 20, p. 869–873.
28. Sterri S.H., Johnsen B.A., Fonnum F. Biochem. Pharmacol. 1985. 34, № 15, p. 2779–2785.

29. *Jokanovic M., Kosanovic M., Maksimovic M.* Arch. Toxicol. 1996. 70, p. 444–450.
30. *Махаева Г.Ф., Веселова В.Л., Мاستрюкова Т.А., Шипов А.Э., Жданова Г.В., Кабачник М.И.* Биоорган. химия. 1983. 9, № 7, с. 920–925.
31. *Махаева Г.Ф., Янковская В.Л., Одоева Г.А, Шесиакова Н.Н., Хованских А.Е., Мастрюкова Т.А., Шипов А.Э., Жданова Г.В., Кабачник М.И.* Биоорган. химия. 1985. 11, № 7, с. 957–962.
32. *Dettbarn W.-D., Yang Z.P., Milatovic D.* Chem.-Biol. Interact. 1999. 119–120, p. 445–454.
33. *Davis C.S., Richardson R.J.* // In: Experimental and Clinical Neurotoxicology. Ed. by S. Spencer and H.H. Schaumburg. Williams & Wilkins, Baltimore, 1980, p. 527–544.
34. *Johnson M.K.* // In: Reviews in Biochemical Toxicology. Ed. by E. Hodgson, J.R. Bend and R.M. Philpot. Elsevier, Amsterdam, New York, 1982, p. 141–212.
35. *Johnson M. K.* Toxicol. and Appl. Pharmacol. 1990. 102, p. 385–399.
36. *He F.* Int. Arch. of Occup. and Environ. Health. 1993. 65, p.69–76.
37. *Costa L.G.* Environ. Health Perspect. 1996. 104, Suppl. 1, p. 55–67.
38. *Lotti M., Moretto A., Zoppellari R., Dainese R., Rizzuto N., Barusco G.* Arch. Toxicol. 1986. 59, p. 176–179.
39. *Schwab B.W., Richardson R.J.* Toxicol. and Appl. Pharmacol. 1986. 83, p. 1–9.
40. *Sigolaeva L.V., Makower A., Eremenko A.V., Makhaeva G.F., Malygin V.V., Kurochkin I.N., Scheller F.W.* Anal. Biochem. 2001. 290, p. 1–9.
41. *Makhaeva G.F., Sigolaeva L.V., Zhuravleva L.V., Eremenko A.V., Kurochkin I.N., Richardson R.J., Malygin V.V.* Proceedings of CBMTS-Industry II: The First World Congress on Chemical and Biological Terrorism, 2002, p. 327–336.
42. *Makhaeva G.F., Sigolaeva L.V., Zhuravleva L.V., Eremenko A.V., Kurochkin I.N., Richardson R.J., Malygin V.V.* J. Toxicol. and Environ. Health. Part A. 2003. 66, p. 599–610.
43. *Johnson M.K.* Arch. Toxicol. 1977. 67, p. 113–115.