

**К 40-летию Института физиологически активных веществ РАН****ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ****ИССЛЕДОВАНИЕ ЭСТЕРАЗНОГО СТАТУСА ОРГАНИЗМА КАК КОМПЛЕКСНОГО  
БИОМАРКЕРА ВОЗДЕЙСТВИЯ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ****Г.Ф. Махаева<sup>1\*</sup>, Е.В. Рудакова<sup>1</sup>, Р.Дж. Ричардсон<sup>2</sup>**<sup>1</sup>Институт физиологически активных веществ Российской академии наук,  
142432, Черноголовка Московской обл., Северный проезд, 1; \*эл. почта: gmakh@ipac.ac.ru<sup>2</sup>Departments of Environmental Health Sciences and Neurology, University of Michigan, Ann Arbor, MI 48109 USA

Разработка системы биомаркеров воздействия фосфорорганических соединений (ФОС) на человека и их количественная оценка являются важным компонентом предсказания и ранней диагностики заболеваний, вызываемых антихолинэстеразными соединениями. Целью нашей работы было исследование эстеразного статуса организма как комплексного биомаркера воздействия ФОС для диагностики воздействия и последующей терапии такого рода интоксикаций. Мы полагаем, что этот комплексный биомаркер будет более эффективным и информативным по сравнению со стандартным определением бутирилхолинэстеразы плазмы крови (БХЭ), ацетилхолинэстеразы эритроцитов (АХЭ) и нейротоксичной эстеразы лимфоцитов (НТЭ). Он позволит: 1) подтвердить или опровергнуть сам факт воздействия ФОС; 2) определить, обусловлено ли воздействие агентами, вызывающими острую и/или отставленную нейротоксичность; 3) провести дозиметрию воздействия, которая даст ценную информацию для последующей терапии отравления. Для подтверждения этой гипотезы мы провели исследование изменения активности АХЭ, НТЭ, БХЭ и карбоксилэстеразы (КЭ) крови мышей через 1 ч после внутрибрюшинного введения возрастающих доз трёх ФОС с различным эстеразным профилем: известного нейротоксичного соединения *O,O*-дипропил-*O*-дихлорвинилфосфата ( $C_3H_7O)_2P(O)OCH=CCl_2$  (diPr-DCIVP) в качестве контрольного соединения и двух модельных диалкилфосфатов –  $(C_2H_5O)_2P(O)OCH(CF_3)_2$  (diEt-PFP) и  $(C_4H_9O)_2P(O)OCH(CF_3)_2$  (diBu-PFP). Измерение активности эстераз проводили в препаратах гемолизованной крови спектрофотометрическим (АХЭ, БХЭ, КЭ) и биосенсорным (НТЭ) методами. Анализ полученных дозозависимостей для ингибирования эстераз крови показал, что БХЭ и КЭ являются наиболее чувствительными биомаркерами, позволяющими детектировать низкие дозы ФОС токсикантов. Одновременное определение активности АХЭ и НТЭ в крови может быть использовано для оценки вероятности воздействия острых и/или отставленных нейротоксикантов.

**Ключевые слова:** ацетилхолинэстераза (АХЭ); бутирилхолинэстераза (БХЭ); нейротоксичная эстераза (НТЭ); карбоксилэстераза (КЭ); кровь; биомаркер; фосфорорганические соединения (ФОС)

**DOI:** 10.18097/BMCRM00028**ВВЕДЕНИЕ**

Фосфорорганические соединения (ФОС), обладающие антихолинэстеразными свойствами, широко используются в качестве инсектицидов, в меньшей степени в качестве терапевтических средств: для лечения шистосомоза, глаукомы и болезни Альцгеймера (БА). Высокотоксичные ФОС производились и использовались рядом стран в качестве химического оружия, и используются террористами в настоящее время. Возросшая активность международного терроризма создаёт угрозу новых сценариев катастроф, в том числе с применением известных фосфорорганических агентов. Помимо этого, широкое применение пестицидов в сельском хозяйстве и в быту делает эти соединения доступными для различных слоев населения и, следовательно, расширяет возможность их использования в террористических целях. ФОС как известной, так и неизвестной структур могут также образовываться в результате инцидентов на химических предприятиях и складах.

Безопасность использования ФОС и защита от возможных воздействий этих соединений в экстремальных ситуациях требуют быстрой, чувствительной и специфичной детекции как самих соединений, так и их биологических эффектов.

Таким образом, разработка системы биомаркеров воздействия ФОС на человека является важным компонентом предсказания и ранней диагностики заболеваний, вызываемых этим соединениями.

Рассмотрим более подробно некоторые основные понятия, используемые в данной статье.

Термин “**биомаркер**” используется для обозначения биологических, биохимических и молекулярных показателей, которые можно измерить с помощью химических, биохимических или молекулярных методов [1]. Биомаркеры характеризуют взаимодействие организма с потенциально опасными агентами различной природы (физической, химической, биологической и т.д.). Желательно, чтобы биомаркеры присутствовали в легко и этически доступных для анализа тканях организма человека, одной из которых является кровь. Биомаркеры обычно делятся на три категории: биомаркеры воздействия, эффекта и чувствительности [2]. ФОС, ковалентно связанные с белками (например, с ферментами или сывороточным альбумином), более устойчивы в организме, чем интактные (свободные) соединения, которые быстро элиминируются защитными системами. В связи с этим актуальной является разработка новых методов идентификации и количественной оценки степени модификации белков-биомаркеров.



Собственная эффективность взаимодействия антихолинэстеразных соединений с эстеразами-мишенями *in vitro* характеризуется “эстеразным профилем” соединения – набором кинетических констант, описывающих ингибиторную активность соединения в отношении эстераз различной функциональной значимости: ацетилхолинэстеразы (АХЭ, КФ 3.1.1.7), нейротоксичной эстеразы (НТЭ, КФ 3.1.1.5), бутирилхолинэстеразы (БХЭ, КФ 3.1.1.8), карбоксилэстеразы (КЭ, КФ 3.1.1.1). Анализ эстеразного профиля позволяет получить более полную картину биологической активности соединения и дать предварительную оценку характеру токсического действия соединения [3].

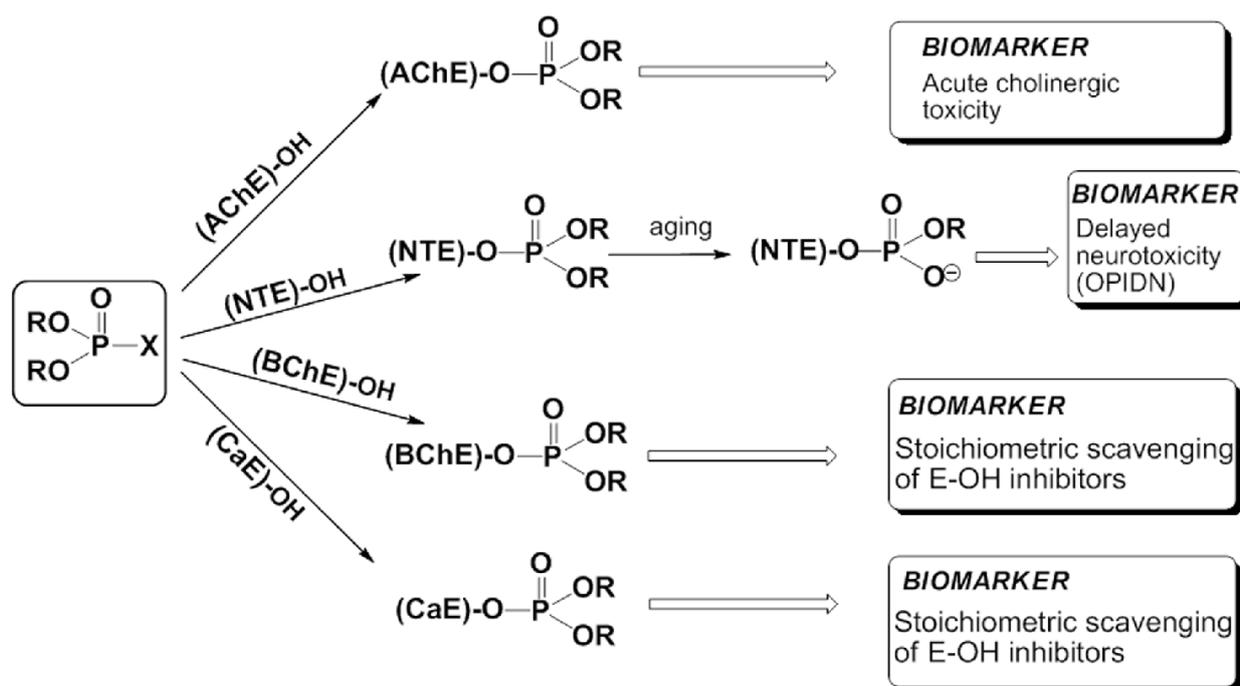
**ОНТФОС** (“отставленная нейротоксичность, вызываемая фосфорорганическими соединениями”) – дистальные нейропатии, проявляющиеся после 2-3-недельного латентного периода в результате воздействия нейропатичного соединения и характеризующиеся дегенерацией длинных аксонов периферической и центральной нервной системы. Такие соединения инактивируют НТЭ предпочтительнее, чем АХЭ [4-6].

**Нейропатичный потенциал** (relative inhibitor potency, RIP) оценивается как относительная ингибиторная способность соединения в отношении двух ферментов-мишеней острой (АХЭ) и отставленной (НТЭ) нейротоксичности:  $RIP = IC_{50}(AChE)/IC_{50}(NTE)$  [7]. Для оценки нейропатичной опасности соединения предложено использовать отношение бимолекулярных констант ингибирования НТЭ в сравнении с АХЭ:  $RIP = k_i(NTE)/k_i(AChE)$  [8, 9]. Показано, что относительная способность ФОС или его активного метаболита ингибировать НТЭ по сравнению с АХЭ коррелирует с отношением между величиной  $LD_{50}$  и минимальной нейропатичной дозой

(доза, вызывающая атаксию). При этом  $RIP > 1$  указывает на то, что соединение может вызывать ОНТФОС в дозе, меньшей  $LD_{50}$ , тогда как величины  $RIP < 1$  свидетельствуют о том, что доза, необходимая для инициирования ОНТФОС, будет выше  $LD_{50}$  [7, 10].

Характерной особенностью ФОС – производных пятивалентного фосфора является их ковалентное взаимодействие с серином активного центра сериновых эстераз. При попадании в организм ФОС конкурентно взаимодействуют с различными сериновыми эстеразами (рис. 1). Эти ферменты включают **первичные биомишени** – АХЭ нервной ткани (мишень острой холинэргической токсичности) [11] и НТЭ (мишень отставленных нейропатий, индуцированных ФОС, ОНТФОС) [8], а также **вторичные мишени** (нецелевые мишени, взаимодействие с которыми не приводит к физиологическому эффекту) такие как бутирилхолинэстераза (БХЭ) и карбоксилэстераза (КЭ), которые действуют как стехиометрические скэвенджеры ФОС, то есть являются сайтами альтернативного фосфорилирования, снижая тем самым концентрацию активного ФОС, доступного для взаимодействия с АХЭ или другими биомишенями [12-14]. В последнее время рассматривают и другие белки, ковалентно связывающие ФОС, такие как ацилпептидгидролаза, гидролаза амидов жирных кислот (fatty acid amide hydrolase), арилформамидаза, сывороточный альбумин [15-17].

Структурное и фармакодинамическое сходство между АХЭ нервной ткани и АХЭ эритроцитов позволяет использовать АХЭ крови в качестве удобной модели для оценки степени ингибирования АХЭ мозга ФОС [11]. Активность АХЭ эритроцитов отражает ситуацию в тканях-мишенях (особенно в периферических отделах, например,



**Рисунок 1.** Взаимодействие ФОС с различными сериновыми эстеразами (E-OH), их возможные токсические эффекты, роль в механизмах токсичности и функции в качестве биомаркеров.

в нервно-мышечных соединениях) и может рассматриваться как подходящий параметр для биологического мониторинга воздействия антихолинэстеразных агентов [18], а также как ценный инструмент для мониторинга и оптимизации в лечебной диагностике.

Нейропатичные соединения в результате селективного ингибирования НТЭ нервной ткани (по сравнению с АХЭ) могут вызывать незначительные или вовсе не вызывать никакихстораживающих признаков острой холинэргической интоксикации. При этом жертвы нейропатичных ФОС могут и не подозревать о том, что они подверглись воздействию до тех пор, пока спустя 1-3 недели не разовьётся клиническая картина ОНТФОС [8]. В связи с этим, частью эффективной стратегии химической защиты является разработка методов обнаружения отставленных нейропатических агентов с помощью чувствительных и селективных биомаркеров [9]. Обнаружение НТЭ в циркулирующих лимфоцитах и тромбоцитах [19-22] позволило использовать данный фермент в качестве биомаркера воздействия нейропатичных ФОС на животных и человека [22-27]. Разработанный нашей группой электрохимический метод определения активности НТЭ с использованием биосенсоров на основе тирозиназы позволил проводить измерения активность НТЭ в цельной крови [28-31], что невозможно сделать с использованием стандартного колориметрического анализа. Созданный биосенсор был использован для установления корреляций между ингибированием НТЭ в головном мозге, лимфоцитах и крови кур через 24 ч после введения нейропатичного соединения *O,O*-дипропил-*O*-дихлорвинилфосфата (diPr-DCIVP) [29]. Эти исследования убедительно продемонстрировали, что НТЭ цельной крови является надёжным биомаркером воздействия нейропатичных ФОС в течение 96 ч с момента воздействия до момента измерения [31].

Поскольку многие ФОС реагируют с нецелевыми эстеразами плазмы крови *in vitro* более эффективно, чем с АХЭ, и, учитывая, что эти белки-скэвенджеры будут первыми сайтами связывания ФОС после их поступления в кровь, именно вторичные мишени, как правило, и являются более чувствительными биомаркерами по сравнению с АХЭ эритроцитов, что позволяет обнаруживать воздействие более низких доз ФОС. Измерение активности БХЭ как в плазме (или сыворотке), так и в цельной крови обычно используется как чувствительный маркер воздействия ФОС [11, 32-34]. В целом, АХЭ и БХЭ, имеющие полупериод жизни 5-16 дней, представляют собой превосходные биомаркеры воздействия ФОС [18].

Набор активностей 4-х сериновых эстераз (АХЭ, НТЭ, БХЭ и КЭ), а также активности параоксоназы (PON1), которая может гидролизовать и детоксицировать ФОС и действовать как каталитический скэвенджер [35], нами было предложено объединить в понятие “эстеразный статус” организма [36-38]. Этот термин в настоящее время является общепринятым [39]. Эстеразный статус включает аспекты воздействия и чувствительности, он в значительной степени

определяет видовую и индивидуальную чувствительность к антихолинэстеразным соединениям и может быть использован в качестве комплексного биомаркера воздействия этих соединений [37].

Мы предположили, что эстеразный статус организма как комплексный биомаркер будет более эффективным и информативным по сравнению со стандартным определением БХЭ плазмы, АХЭ эритроцитов и НТЭ лимфоцитов [37, 40]. Определение эстеразного статуса позволит: 1) оценить сам факт воздействие ФОС на человека или подтвердить его отсутствие; 2) определить, обусловлено ли воздействие агентами, вызывающими острую и/или отставленную нейротоксичность; 3) провести дозиметрию воздействия, которая даст ценную информацию для лечения. Одновременное определение активностей 4-х эстераз и PON1, гидролизующей ФОС и в значительной степени определяющей чувствительность к этим соединениям, позволит улучшить возможности диагностики и прогноза развития интоксикаций.

Для подтверждения нашей гипотезы мы провели детальное исследование изменения активности АХЭ, НТЭ, БХЭ и КЭ крови мышей через 1 ч после внутрибрюшинного (в/бр) введения возрастающих доз трёх ФОС с различными эстеразным профилем и различной острой холинэргической и отставленной нейротоксичностью: известного нейропатичного соединения *O,O*-дипропил-*O*-дихлорвинилфосфата ( $C_3H_7O_2P(O)OCH=CCl_2$  (diPr-DCIVP) в качестве контрольного соединения и двух модельных соединений, представителей фосфорилированных гексафторизопренолов – этильного ( $C_2H_5O_2P(O)OCH(CF_3)_2$  (diEt-PFP) и бутильного ( $C_4H_9O_2P(O)OCH(CF_3)_2$  (diBu-PFP) производных.

diPr-DCIVP – высокотоксичное соединение ( $LD_{50} = 10$  мг/кг, куры [41], 15 мг/кг, мыши [42]), которое обладает и высоким нейропатичным потенциалом ( $RIP = 2.6$ , куры [7]); diEt-PFP обладает средней острой токсичностью ( $LD_{50} = 200$  мг/кг) и низким нейропатичным потенциалом ( $RIP = 0.07$ ) [43]; более гидрофобный diBu-PFP наоборот имеет низкую острую токсичность ( $LD_{50} > 2000$  мг/кг) и высокий нейропатичный потенциал ( $RIP = 6.6$ ) [44].

Перед проведением исследования были разработаны спектрофотометрические методы анализа АХЭ, БХЭ и КЭ в цельной крови [38] и определены базовые активности АХЭ, БХЭ, КЭ и НТЭ в крови мышей [38, 45, 46]. Ранее в детальном исследовании нами было показано, что НТЭ крови мышей дозо-зависимым образом отражает действие нейропатичных ФОС и является надёжным биохимическим маркером воздействия нейропатичных соединений [47, 48].

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Материалы

В работе использованы следующие реактивы: S-ацетилтихолин иодид (АТХ); S-бутирилтихолин иодид (БТХ); 5,5'-дителиобис-2-нитробензойная

кислота (ДТНБ), трис(гидроксиметил)аминометан гидрохлорид (Трис), феррицианид калия ( $K_3[Fe(CN)_6]$ ), этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), протеин стандарт – бычий сывороточный альбумин (BSA), хлорид кальция ( $CaCl_2$ ); диметилсульфоксид (ДМСО), этопропазин (ЭПр), 1-нафтилацетат (1-NA), 4-нитрофенилацетат (4-NPA), фенилацетат (PhA), эзерин, диэтил-4-нитрофениловый эфир фосфорной кислоты (параоксон, PO), тетра(моноизопропил)пирофосфотетрамид (iso-OMPA), бис-*para*-нитрофенилфосфат (BNPP) фирмы “Sigma-Aldrich” (США); 4-аминоантипирин (4-ААП) (“Acros organics”, Бельгия); фенилвалерат (PhV) и мипафокс (MX) (“Oryza Laboratory Inc.”, США), цитрат натрия (“Merck”, Германия). О-фосфорилированные гексафторизопропанола (PFP): *O,O*-диэтил-*O*-(1-трифторметил-2,2,2-трифторэтил)фосфат (diEt-PFP) и *O,O*-дибутил-*O*-(1-трифторметил-2,2,2-трифторэтил)фосфат (diBu-PFP); *O,O*-ди-1-пропил-*O*-2,2-дихлорвинилфосфат (diPr-DC1VP) синтезированы и охарактеризованы в лаборатории синтеза физиологически активных веществ ИФАВ РАН. Синтез diEt-PFP и diBu-PFP проводился по методу, описанному в работах [43, 49]. Все остальные реактивы были марки не ниже х.ч. и использовались без предварительной очистки. Все водные растворы готовились в бидистиллированной воде.

#### Исследование эстеразного профиля соединений

В качестве стандартных источников ферментов использовались коммерческие препараты ферментов фирмы “Sigma-Aldrich” – АХЭ эритроцитов человека, БХЭ сыворотки крови лошади, КЭ печени свиньи, и стабильный лиофилизированный препарат НТЭ мозга кур (ЛиюНТЭ), полученный по методике, разработанной в нашей лаборатории [50]. Активность АХЭ и БХЭ определяли колориметрическим методом Элмана [51] с использованием ацетил- и бутирилтиохолина в качестве субстрата. 4-Нитрофенилацетат использовали для спектрофотометрического измерения активности КЭ. НТЭ определяли методом дифференциального ингибирования по Johnson [52], субстрат – фенилвалерат, как детально описано в работе [29]. Измерения проводились на микропланшетном ридере Bio-Rad Benchmark Plus (Франция). Исследуемые ФОС растворяли в ДМСО. Для кинетических исследований ингибирования АХЭ, НТЭ, БХЭ и КЭ *in vitro* препарат соответствующего фермента инкубировали с ингибитором в рабочем буфере с конечной концентрацией ДМСО не более 1% по объёму в течение разных интервалов времени, затем определяли остаточную активность фермента. Измерения проводились в трёх повторах для каждого эксперимента. Величины бимолекулярных констант ингибирования эстераз исследуемыми ФОС ( $k_i$ ,  $M^{-1} \times \text{мин}^{-1}$ ) определяли в соответствии с [53]. Расчёт и регрессионный анализ проводились с использованием программы Origin 6.1.

#### Эксперименты на животных

Эксперименты *in vivo* проводили на самцах белых аутбредных мышей линии CD1 весом 20-25 г

в возрасте 1.5-2 месяцев (Пушино, Россия). Содержание животных и все эксперименты осуществлялись в соответствии с протоколами, одобренными Комитетом по этике Института физиологически активных веществ РАН (Черноголовка, Россия).

diEt-PFP, diBu-PFP и diPr-DC1VP растворяли в ДМСО и вводили однократно внутривенно (в/вр) в 8-10 возрастающих дозах в объеме около 0.1 мл. Для каждой дозы использовали не менее 6 животных. diPr-DC1VP вводили на фоне предварительного (за 20 мин) в/вр введения атропин-сульфата (водный раствор, 20 мг/кг), контрольные животные получали атропин-сульфат и ДМСО. В экспериментах с diEt-PFP и diBu-PFP контрольным животным вводили только ДМСО. Через 1 ч мышей декапитировали в условиях  $CO_2$ -анестезии. Кровь каждого животного немедленно собирали в стеклянные стаканчики, содержащие 3.8% (в./об.) охлаждённого цитрата натрия (0.2 мл антикоагулянта/1 мл крови). Затем кровь аликвотировали, замораживали в жидком азоте и хранили при  $-70^\circ C$  до проведения измерений. Значения  $ED_{50}$  – медианная эффективная доза, мг/кг (доза соединения, при введении которой активность фермента снижается на 50%) получали в результате анализа зависимостей доза-ответ с использованием программы Origin 6.1.

#### Приготовление препаратов гемолизированной крови

Замороженные образцы крови медленно оттаивали при  $+4^\circ C$  и разбавляли 1:100 (объём:объём) охлаждённым 0.1 М К-Na-фосфатным буфером (рН 7.5). После тщательного перемешивания в течение 2 мин образцы гемолизированной крови аликвотировали в пластиковые пробирки Falcon, немедленно замораживали в жидком азоте для обеспечения полного гемолиза и хранили при  $-20^\circ C$  до проведения измерений. Перед началом измерений образцы медленно оттаивали на водяной бане со льдом.

#### Определение активности эстераз в препаратах крови мышей

Активность АХЭ в гемолизированной крови мышей оценивали по скорости гидролиза 1 мМ ацетилтиохолина колориметрическим методом Элмана [51] в 0.1 М К-Na-фосфатном буфере (рН 7.5) при  $25^\circ C$  в присутствии специфического ингибитора БХЭ этопропазина (0.02 мМ) [54-56]. Для снижения интерферирующего влияния абсорбции гемоглобина стандартная длина волны для метода Элмана (412 нм,  $\epsilon_{412}=14150 M^{-1} \times \text{см}^{-1}$ ) была изменена на 436 нм ( $\epsilon_{436}=10600 M^{-1} \times \text{см}^{-1}$ ) [56]. Активность БХЭ в крови измеряли в тех же условиях с использованием 1 мМ бутирилтиохолина в качестве субстрата.

Спектрофотометрическое определение активности КЭ в гемолизированной крови проводили с использованием 1 мМ 1-нафтилацетата в качестве субстрата при  $\lambda=322$  нм ( $\epsilon_{322}=2200 M^{-1} \times \text{см}^{-1}$ ) [57, 58] в 0.1 М К-Na-фосфатном буфере (рН 8.0) при  $25^\circ C$ . Для элиминирования активности PON1 и холинэстераз, гидролизующих 1-нафтилацетат, перед его внесением реакционную смесь инкубировали в течение 10 мин

со специфическими ингибиторами PON1/арилэстераз (2 мМ ЭДТА) и холинэстераз (40 мкМ эзерин) [59].

Активность НТЭ в крови определяли методом дифференциального ингибирования [52] с электрохимической детекцией, как описано ранее [28, 29] (субстрат – фенилвалерат). Для амперометрического измерения продукта реакции (фенола) использовали чувствительный, стабильный планарный тирозиназный биосенсор конструкции SPE/PDDA/Туг. Данный биосенсор был разработан с помощью комбинации технологии трафаретной печати для подготовки графитовой подложки и LBL-технологии последовательного (слой-за-слоем) нанесения полиэлектролитов [46, 60].

Образцы гемолизированной крови 1:100 (объём:объём) инкубировали при 37°C в течение 20 мин с 50 мкМ раствором параоксона (проба В) и, параллельно, с 50 мкМ параоксоном плюс 250 мкМ мипафоксом (проба С). Затем в обе пробы вносили субстрат фенилвалерат (конечная концентрация 0.54 мМ) и инкубацию продолжали в течение следующих 40 мин при 37°C. Реакцию останавливали добавлением 100 мкл 1% (масса/объём) водного раствора SDS. Общий объём реакционной смеси составлял 600 мкл. Образовавшийся в результате реакции фенол детектировали амперометрически после 20-50-кратного разбавления образцов 50 мМ Na-фосфатным буфером, содержащим 100 мМ NaCl (рН 7.0). Аналитический сигнал сенсора определяли как разность величин стационарного тока до и после добавления пробы. Активности НТЭ рассчитывали, используя калибровочные зависимости по фенолу, полученные в тех же условиях, и вводили поправку на спонтанный гидролиз субстрата, измеренный в отдельных экспериментах. Активность НТЭ рассчитывали как разность фенилвалерат-гидролизующей активности в пробах В и С.

**Определение острой токсичности** соединений было выполнено на самцах белых аутбредных мышей весом 20-25 г при в/бр введении 5-7 доз каждого соединения, 6-8 животных для каждой дозы. Срок наблюдения – 24 ч. Величины LD<sub>50</sub> вычисляли методом пробит-анализа с использованием программы BioStat 2006 Professional.

#### Статистическая обработка результатов

Статистическая обработка и анализ результатов проводились с использованием программы GraphPad Prism 3.02. Результаты представлены как means±SEM,

**Таблица 1.** Ингибиторная активность *in vitro* ( $k_i$ , M<sup>-1</sup>×мин<sup>-1</sup>) diEt-PFP, diBu-PFP и diPr-DCIWP в отношении ферментных препаратов АХЭ, НТЭ, БХЭ, КЭ (эстеразный профиль соединений)

$k_i$ , M <sup>-1</sup> ×мин <sup>-1</sup>				
Соединение	АХЭ	НТЭ	БХЭ	КЭ
diEt-PFP	(1.80±0.11)×10 <sup>3</sup>	(1.31±0.08)×10 <sup>2</sup>	(4.50±0.19)×10 <sup>3</sup>	(1.02±0.04)×10 <sup>5</sup>
diBu-PFP	(8.44±0.34)×10 <sup>4</sup>	(5.6±0.18)×10 <sup>5</sup>	(2.47±0.43)×10 <sup>6</sup>	(1.09±0.08)×10 <sup>7</sup>
diPr-DCIWP	(5.97±0.12)×10 <sup>5</sup>	(2.10±0.16)×10 <sup>6</sup>	(1.03±0.11)×10 <sup>7</sup>	(4.7±0.21)×10 <sup>7</sup>

доверительный интервал p<0.05. Графики зависимостей, регрессионный анализ, корреляции получены с помощью программы Origin 6.1.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Исследование ингибиторной активности diEt-PFP, diBu-PFP и diPr-DCIWP *in vitro* (эстеразный профиль соединений)

Прежде всего, мы определили ингибиторную активность исследуемых ФОС *in vitro* в отношении всех эстераз с использованием стандартного набора коммерческих ферментных препаратов – АХЭ эритроцитов человека, БХЭ сыворотки крови лошади, КЭ печени свиньи и полученного в лаборатории стабильного лиофилизованного препарата НТЭ мозга кур (ЛиоНТЭ) [50], и оценили острую токсичность соединений для мышей, LD<sub>50</sub> (мг/кг) при в/бр введении через 24 ч.

Ингибиторная активность diEt-PFP, diBu-PFP и diPr-DCIWP *in vitro* в отношении АХЭ, БХЭ, КЭ и НТЭ, характеризующая эстеразный профиль соединений, представлена в таблице 1.

Важной характеристикой эстеразного профиля соединений является их ингибиторная селективность, которая определяется как отношение соответствующих величин бимолекулярных констант ингибирования  $k_i$ :  $S_{X,Y} = k_i(E_X)/k_i(E_Y)$ , где X,Y = АХЭ, НТЭ, БХЭ, КЭ. Величины ингибиторной селективности исследуемых ФОС в отношении АХЭ, БХЭ, КЭ и НТЭ и острая токсичность соединений (LD<sub>50</sub>, мг/кг) приведены в таблице 2. Полученные результаты хорошо согласуются с ранее опубликованными данными [43, 49].

Как видно из таблиц 1 и 2, все соединения ингибируют вторичные мишени, БХЭ и КЭ, более эффективно по сравнению с первичными мишенями, АХЭ и НТЭ.

При этом diEt-PFP, обладающий умеренной острой токсичностью (LD<sub>50</sub>=200 мг/кг), проявляет низкую ингибиторную активность в отношении обеих первичных мишеней, АХЭ и НТЭ, имеет очень низкий нейротоксичный потенциал (RIP=0.07) и проявляет высокую селективность в отношении эстераз-скэвенджеров БХЭ и КЭ по сравнению с НТЭ.

Практически нетоксичный diBu-PFP (LD<sub>50</sub>>2000 мг/кг) обладает более высокой ингибиторной активностью в отношении первичных мишеней АХЭ и НТЭ по сравнению

**Таблица 2.** Ингибиторная селективность diEt-PFP, diBu-PFP и diPr-DCIVP в отношении АХЭ, НТЭ, БХЭ, КЭ и острая токсичность соединений

Селективность = отношение соответствующих $k_i$ : $S(\text{ЕОН}_X/\text{ЕОН}_Y) = k_i(\text{ЕОН}_X)/k_i(\text{ЕОН}_Y)^*$						LD <sub>50</sub> , мг/кг
Соединение	БХЭ/АХЭ	КЭ/АХЭ	БХЭ/НТЭ	КЭ/НТЭ	НТЭ/АХЭ = RIP	
diEt-PFP	2.5	56.6	34.6	778.6	0.07	200 (161÷239)
diBu-PFP	29.3	129	4.4	19.5	6.6	>2000
diPr-DCIVP	17.25	78.7	4.9	23.5	3.5	15 (13.4÷17.3)

Примечание: \* - X,Y = АХЭ, НТЭ, БХЭ, КЭ.

**Таблица 3.** Эффективность ингибирования (ED<sub>50</sub>, мг/кг) эстераз крови мышей через 1 ч после в/бр введения diEt-PFP, diBu-PFP и diPr-DCIVP

Соединение	ED <sub>50</sub> , мг/кг				ED <sub>50</sub> (НТЭ)/ED <sub>50</sub> (АХЭ)
	АХЭ	НТЭ	БХЭ	КЭ	
diEt-PFP	>300*	нет ингибирования при дозе 200 мг/кг	46.8±1.5	25.0±1.0	0
diBu-PFP	154±5.0	36.3±3.6	25.1±3.6	3.1±0.3	4.24
diPr-DCIVP	4.0±0.2	2.0±0.1	1.58±0.11	<0.2**	2.0

Примечание: \* - 30% ингибирования при дозе 200 мг/кг; \*\* - 70% ингибирования при дозе 0.3 мг/кг.

с этильным производным, с предпочтительным ингибированием НТЭ и, соответственно, имеет высокий нейротоксичный потенциал (RIP=6.6), при этом проявляет высокую селективность в отношении БХЭ и КЭ по сравнению с АХЭ.

Высокотоксичный diPr-DCIVP (LD<sub>50</sub>=15 мг/кг) является наиболее сильным ингибитором как АХЭ, так и НТЭ и имеет высокий нейротоксичный потенциал (RIP=3.5).

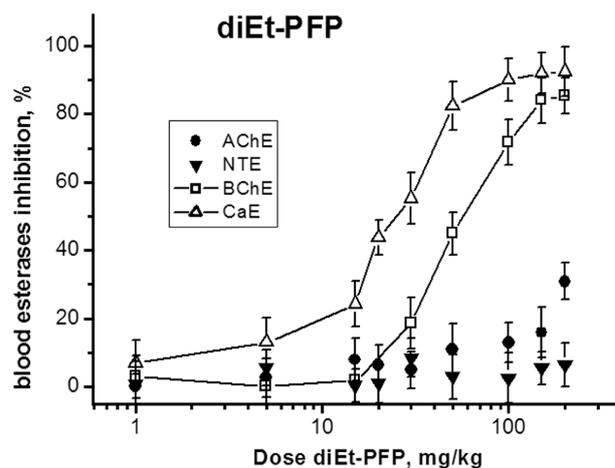
Таким образом, выбранные для исследования соединения обладают широким спектром собственной ингибиторной активности в отношении рассматриваемых эстераз и широким интервалом острой и отставленной нейротоксичности.

#### Исследование эффектов ФОС с различным эстеразным профилем на уровне целого организма (in vivo)

Следующим этапом работы было исследование ингибирования АХЭ, НТЭ, БХЭ и КЭ крови мышей через 1 ч после в/бр введения возрастающих доз diEt-PFP, diBu-PFP и diPr-DCIVP. Результаты экспериментов представлены на рисунках 2-4.

Как видно из рисунка 2, diEt-PFP дозозависимым образом ингибирует БХЭ и КЭ крови мышей, причём ингибирование КЭ начинается при более низких дозах. В результате анализа кривых доза-эффект (рис. 2) были получены значения ED<sub>50</sub> (медианные эффективные дозы) для ингибирования вторичных биомшеней БХЭ и КЭ в крови мышей

данном соединением: ED<sub>50</sub>(БХЭ)=46.8±1.5 мг/кг; ED<sub>50</sub>(КЭ)=25.0±1.0 мг/кг (табл. 3). Что касается первичных мишеней, то при введении максимальной дозы diEt-PFP (200 мг/кг, равной LD<sub>50</sub>) отсутствует значимый ингибиторный эффект в отношении НТЭ крови, что подтверждает безопасность diEt-PFP с точки зрения развития отставленной



**Рисунок 2.** Дозозависимое ингибирование БХЭ и КЭ в крови мышей через 1 ч после в/бр введения diEt-PFP. Результаты представлены в виде % ингибирования активности каждой из эстераз по отношению к контролю, mean±SEM, n=6. Активности эстераз у контрольных животных, мкмоль/(мин×мл) крови, mean±SEM: АХЭ - 1.02±0.15 (n=12), БХЭ - 0.63±0.03 (n=12), КЭ - 6.2±0.14 (n=12), НТЭ - 0.017±0.003 (n=8).

нейропатии и соответствует низким величинам  $RIP=0.07$  (табл. 2). В отношении АХЭ наблюдается довольно слабое торможение активности – примерно на 30%, что хорошо согласуется с умеренной острой холинергической токсичностью соединения ( $LD_{50}=200$  мг/кг, табл. 2). Исходя из имеющихся данных (рис. 2), мы предположили, что значение  $ED_{50}$ (АХЭ) должно быть более 300 мг/кг (табл. 3). Таким образом, при в/бр введении diEt-PFP БХЭ и КЭ крови являются более чувствительными биомаркерами воздействия, чем АХЭ крови. В данном случае БХЭ и КЭ могут рассматриваться как биомаркеры острой токсичности.

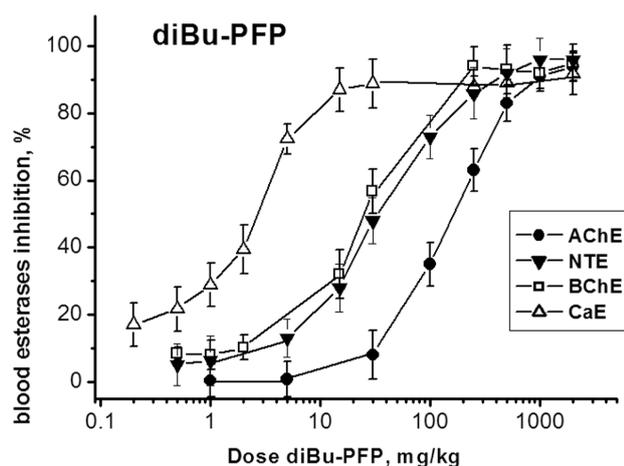
При в/бр введении diBu-PFP ингибирует все четыре эстеразы крови чётко дозозависимым образом (рис. 3). В результате анализа кривых доза-эффект (рис. 3) были получены значения  $ED_{50}$  для ингибирования АХЭ, НТЭ, БХЭ и КЭ крови мышей данным соединением:  $ED_{50}$ (АХЭ)=154±5 мг/кг;  $ED_{50}$ (НТЭ)=36.3±3.6 мг/кг;  $ED_{50}$ (БХЭ)=25.1±3.6 мг/кг;  $ED_{50}$ (КЭ)=3.1±0.3 мг/кг (табл. 3). Как видно из рисунка 3, ингибиторная активность diBu-PFP в отношении НТЭ крови значительно выше, чем в отношении АХЭ:  $ED_{50} = 36$  и 154 мг/кг, соответственно (табл. 3). Высокая ингибиторная селективность diBu-PFP в отношении НТЭ по сравнению с АХЭ крови, рассчитанная как отношение  $ED_{50}$ (АХЭ)/ $ED_{50}$ (НТЭ)=4.24 (табл. 3), подтверждает высокую нейропатичную опасность этого низкоокисного соединения ( $LD_{50}>2000$  мг/кг), предсказанную из анализа его эстеразного профиля, и соответствует величине  $RIP=6.6$  (табл. 2). Полученные данные указывают на то, что при воздействии diBu-PFP возможно развитие ОНТФОС без проявления признаков острой холинергической токсичности. Эстеразы-скэвенджеры – БХЭ и особенно КЭ – ингибируются данным соединением при более низких дозах, чем первичные мишени – АХЭ и НТЭ (табл. 3), то есть, являются

более чувствительными биомаркерами воздействия diBu-PFP, чем первичные мишени. Таким образом, в случае нетоксичного в плане острой холинергической токсичности diBu-PFP, БХЭ и КЭ крови можно рассматривать как биомаркеры отставленной нейротоксичности.

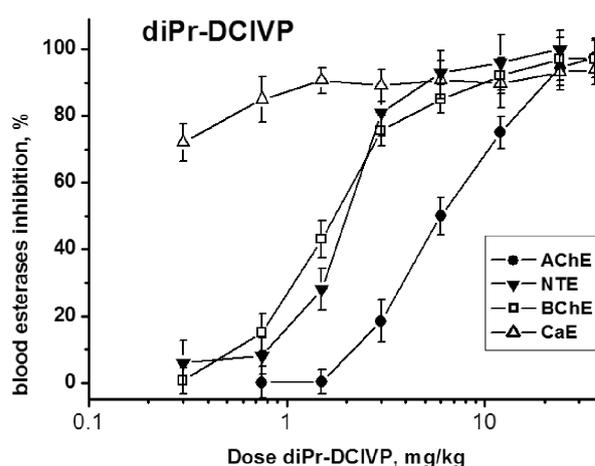
diPr-DC1VP при в/бр введении также вызывает дозозависимое ингибирование всех исследуемых эстераз крови (рис. 4). В результате анализа кривых доза-эффект были получены значения  $ED_{50}$  для ингибирования АХЭ, НТЭ и БХЭ крови мышей данным соединением:  $ED_{50}$ (АХЭ)=4.0±0.2 мг/кг;  $ED_{50}$ (НТЭ)=2.0±0.1 мг/кг;  $ED_{50}$ (БХЭ)=1.58±0.11 мг/кг, что говорит о наибольшей ингибиторной эффективности diPr-DC1VP в отношении всех эстераз по сравнению с diBu-PFP и diEt-PFP. Высокая степень ингибирования КЭ крови – 70% ингибирования при минимальной введённой дозе diPr-DC1VP (0.3 мг/кг), не позволила рассчитать величины  $ED_{50}$ . Исходя из имеющихся данных, мы предположили, что значение  $ED_{50}$ (КЭ) должно быть менее 0.2 мг/кг (табл. 3).

diPr-DC1VP обладает высокой острой токсичностью ( $LD_{50}=15$  мг/кг, табл. 2), высокой ингибиторной активностью в отношении АХЭ и НТЭ (табл. 1) и высоким нейропатичным потенциалом ( $RIP=3.5$ , табл. 2). Данное соединение ингибирует АХЭ крови при низких дозах:  $ED_{50}$ (АChE)=4.0±0.2 мг/кг, при этом в отношении НТЭ крови оно ещё более активно:  $ED_{50}$ (NTE)=2.0±0.1 мг/кг. Отношение  $ED_{50}$ (АChE)/ $ED_{50}$ (NTE) = 2 согласуется с высоким значением  $RIP=3.5$  для diPr-DC1VP (табл. 2) и указывает на высокую нейропатичную опасность этого токсичного соединения. При отравлении данным соединением ОНТФОС может развиваться после успешного лечения острой холинергической токсичности.

diPr-DC1VP ингибирует БХЭ и особенно КЭ при более низких дозах, чем НТЭ и АХЭ (рис. 4). Таким образом, в случае воздействия diPr-DC1VP БХЭ и КЭ крови являются более чувствительными



**Рисунок 3.** Дозозависимое ингибирование АХЭ, НТЭ, БХЭ и КЭ в крови мышей через 1 ч после в/бр введения diBu-PFP. Результаты представлены в виде % ингибирования активности каждой из эстераз у контрольных животных,  $mean \pm SEM$ ,  $n=6$ . Активности эстераз у контрольных животных представлены в подписи к рисунку 2.



**Рисунок 4.** Дозозависимое ингибирование АХЭ, НТЭ, БХЭ и КЭ в крови мышей через 1 ч после в/бр введения diPr-DC1VP. Результаты представлены в виде % ингибирования активности каждой из эстераз у контрольных животных,  $mean \pm SEM$ ,  $n=6$ . Активности эстераз у контрольных животных представлены в подписи к рисунку 2.

биомаркерами, чем АХЭ и НТЭ. В данном случае БХЭ и КЭ являются биомаркерами как острой, так и отставленной нейротоксичности.

Величины ED<sub>50</sub>, рассчитанные из полученных дозозависимостей, характеризуют чувствительность эстераз крови как биомаркеров воздействия для каждого соединения (табл. 3).

Анализ результатов, представленных в таблице 3, показывает, что эстеразы-скэвенджеры БХЭ и КЭ, характеризующиеся более низкими величинами ED<sub>50</sub>, являются более чувствительными биомаркерами, чем АХЭ и НТЭ крови, и поэтому они могут детектировать воздействие более низких доз ФОС токсикантов. Этот вывод согласуется с литературными данными [1, 2, 40]. Оценка снижения активности БХЭ и КЭ позволяет выявить воздействие более низких доз ФОС токсикантов и получить информацию о самом факте воздействия [1]. При этом БХЭ и КЭ могут быть чувствительными к воздействию агентов, вызывающих как острую, так и отставленную нейротоксичность, поэтому степень их ингибирования может служить общим биомаркером воздействия ФОС.

Одновременное определение активности АХЭ и НТЭ в крови позволяет дифференцировать воздействие острых и отставленных нейротоксикантов. Соотношение между ингибированием НТЭ и АХЭ, измеренное в крови, характеризует вероятность развития ОНТФОС по сравнению с острой холинэргической токсичностью. Как показывают результаты исследования, ингибирование всех эстераз крови имеет дозозависимый характер, поэтому степень ингибирования эстераз крови позволяет оценить уровень воздействия, то есть провести дозиметрию воздействия, которая дает ценную информацию для терапии отравления.

Таким образом, проведенное исследование с использованием ФОС, обладающих широким спектром собственной ингибиторной активности в отношении анализируемых эстераз и широким интервалом острой и отставленной нейротоксичности, показывает, что эстеразный статус, объединяющий как биомаркеры воздействия ФОС, так и биомаркеры чувствительности организма к этим соединениям, можно рассматривать в качестве комплексного биомаркера воздействия ФОС.

Следует отметить, что оценка эстеразного статуса организма может быть полезным инструментом при реализации целого ряда задач, в частности при ликвидации последствий химических катастроф и химических террористических актов для уточнения диагноза отравления, прогноза развития интоксикации и оптимизации лечения; для биомониторинга лиц, связанных с производством и применением фосфорорганических и карбаматных пестицидов и оценки риска развития у них интоксикаций на основе данных по анализу активности набора эстераз и их генотипированию; для биомониторинга пациентов при лечении антихолинэстеразными препаратами, в частности, при терапии БА и миастении Гравис, а также для решения задач, не связанных с воздействием ингибиторов холинэстераз:

в терапии заболеваний сердечно-сосудистой системы, в анестезиологии, в фундаментальных исследованиях молекулярного полиморфизма человека, в фундаментальных и прикладных исследованиях по созданию персонализированной медицины.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы НАТО “Наука во имя мира и безопасности” (грант № SfP 984082) и Государственного задания 2018 года (тема № 0090-2017-0019). Авторы выражают благодарность сотрудникам лаборатории молекулярной токсикологии ИФАВ РАН О.Г. Серебряковой и Т.Г. Галенко за помощь в проведении токсикологических экспериментов и работу с животными.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Costa, L.G. (1996) Biomarker research in neurotoxicology: the role of mechanistic studies to bridge the gap between the laboratory and epidemiological investigations. *Environmental Health Perspectives*, 104 Suppl 1, 55-67.
2. National Research Council (1987) Biological markers in environmental health research. *Environmental Health Perspectives*, 74, 3-9.
3. Makhaeva, G.F., Radchenko, E.V., Palyulin, V.A., Rudakova, E.V., Aksinenko, A.Y., Sokolov, V.B., Zefirov, N.S., & Richardson, R.J. (2013) Organophosphorus compound esterase profiles as predictors of therapeutic and toxic effects. *Chemico-Biological Interactions*, 203(1), 231-237. DOI: 10.1016/j.cbi.2012.10.012
4. Richardson, R.J., Hein, N.D., Wijeyesakere, S.J., Fink, J.K., & Makhaeva, G.F. (2013) Neuropathy target esterase (NTE): overview and future. *Chemico-Biological Interactions*, 203(1), 238-244. DOI: 10.1016/j.cbi.2012.10.024
5. Richardson, R.J., & Makhaeva, G.F. (2014) Organophosphorus Compounds. In P. Wexler (Ed.), *Encyclopedia of Toxicology* (3rd edition ed., Vol. 3, pp. 714-719): Elsevier Inc., Academic Press.
6. Richardson, R.J., Worden, R.M., Wijeyesakere, S.J., Hein, N.D., Fink, J.K., & Makhaeva, G.F. (2015) Neuropathy Target Esterase as a Biomarker and Biosensor of Delayed Neuropathic Agents. 935-952. DOI: 10.1016/b978-0-12-800159-2.00063-4
7. Lotti, M., & Johnson, M.K. (1978) Neurotoxicity of organophosphorus pesticides: predictions can be based on *in vitro* studies with hen and human enzymes. *Archives of Toxicology*, 41(3), 215-221. DOI: 10.1007/bf00354093
8. Richardson, R.J. (2005) Organophosphate Poisoning, Delayed Neurotoxicity. In P. Wexler (Ed.), *Encyclopedia of Toxicology* (Second ed., Vol. 3, pp. 302-306). Oxford: Elsevier.
9. Richardson, R.J., Worden, R.M., & Makhaeva, G.F. (2009) Biomarkers and Biosensors of Delayed Neuropathic Agents. In R. C. Gupta (Ed.), *Handbook of the Toxicology of Chemical Warfare Agents* (pp. 859-876): Elsevier.
10. Johnson, M.K. (1982) The target for initiation of delayed neurotoxicity by organophosphorus esters: Biochemical studies and toxicological applications. In J. R.B.E. Hodgson, R.M. Philpot (Ed.), *Reviews in Biochemical Toxicology* (Vol. 4, pp. 141-212). Amsterdam: Elsevier.
11. Thompson, C.M., & Richardson, R.J. (2005) Anticholinesterase Insecticides. In T.C. Marrs & B. Ballantyne (Eds.), *Pesticide*

- Toxicology and International Regulation (Current Toxicology Series) (pp. 89-127). John Wiley & Sons, Ltd.
12. Makhaeva, G.F., Iankovskaia, V.L., Kovaleva, N.V., Fetisov, V.I., Malygin, V.V., Torgasheva, N.A., & Khaskin, B.A. (1999) [O,O-dialkyl-S-bromomethylthiophosphates - inhibitors of mammalian choline- and carboxyl esterases: structure-activity relationship]. *Bioorganicheskaia Khimiia*, 25(1), 3-7.
13. Jokanovic, M. (2001) Biotransformation of organophosphorus compounds. *Toxicology*, 166(3), 139-160.
14. Masson, P., & Lockridge, O. (2010) Butyrylcholinesterase for protection from organophosphorus poisons: catalytic complexities and hysteretic behavior. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 494(2), 107-120. DOI: 10.1016/j.abb.2009.12.005
15. Casida, J.E., & Quistad, G.B. (2004) Organophosphate toxicology: safety aspects of nonacetylcholinesterase secondary targets. *Chemical Research in Toxicology*, 17, 983-998. DOI: 10.1021/tx0499259
16. Peebles, E.S., Schopfer, L.M., Duysen, E.G., Spaulding, R., Voelker, T., Thompson, C.M., & Lockridge, O. (2005) Albumin, a new biomarker of organophosphorus toxicant exposure, identified by mass spectrometry. *Toxicological Sciences*, 83(2), 303-312. DOI: 10.1093/toxsci/kfi023
17. Tarhoni, M.H., Lister, T., Ray, D.E., & Carter, W.G. (2008) Albumin binding as a potential biomarker of exposure to moderately low levels of organophosphorus pesticides. *Biomarkers*, 13(4), 343-363. DOI: 10.1080/13547500801973563
18. Bajgar, J. (1992) Biological monitoring of exposure to nerve agents. *British Journal of Industrial Medicine*, 49, 648-653.
19. Bertoncin, D., Russolo, A., Caroldi, S., & Lotti, M. (1985) Neuropathy target esterase in human lymphocytes. *Archives of Environmental Health*, 40(3), 139-144. DOI: 10.1080/00039896.1985.10545905
20. Dudek, B.R., & Richardson, R.J. (1982) Evidence for the existence of neurotoxic esterase in neuronal and lymphatic tissue of the adult hen. *Biochemical Pharmacology*, 31, 1117-1121.
21. Maroni, M., & Bleecker, M.L. (1986) Neuropathy target esterase in human lymphocytes and platelets. *Journal of Applied Toxicology*, 6(1), 1-7.
22. Richardson, R.J., & Dudek, B.R. (1983) Neurotoxic esterase: Characterization and potential for a predictive screen for exposure to neuropathic organophosphates. In P. C. K. J. Miyamoto (Ed.), *Pesticide Chemistry: Human Welfare and the Environment* (Vol. 3, pp. 491-495). Oxford: Pergamon
23. Lotti, M. (1986) Biological monitoring for organophosphate-induced delayed polyneuropathy. *Toxicology Letters*, 33(1-3), 167-172. DOI: 10.1016/0378-4274(86)90080-9
24. Lotti, M., Becker, C.E., Aminoff, M.J., Woodrow, J.E., Seiber, J.N., Talcott, R.E., & Richardson, R.J. (1983) Occupational exposure to the cotton defoliant DEF and merphos. A rational approach to monitoring organophosphorus-induced delayed neurotoxicity. *Journal of Occupational Medicine*, 25(7), 517-522.
25. Lotti, M., Moretto, A., Zoppellari, R., Dainese, R., Rizzuto, N., & Barusco, G. (1986) Inhibition of lymphocytic neuropathy target esterase predicts the development of organophosphate-induced delayed polyneuropathy. *Archives of Toxicology*, 59(3), 176-179. DOI: 10.1007/BF00316329
26. Schwab, B.W., & Richardson, R.J. (1986) Lymphocyte and brain neurotoxic esterase: Dose and time dependence of inhibition in the hen examined with three organophosphorus esters. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 83(1), 1-9. DOI: 10.1016/0041-008x(86)90317-0
27. Lotti, M. (1987) Organophosphate-induced delayed polyneuropathy in humans: Perspectives for biomonitoring. *Trends in Pharmacological Sciences*, 81, 176-177.
28. Sigolaeva, L.V., Makower, A., Eremenko, A.V., Makhaeva, G.F., Malygin, V.V., Kurochkin, I.N., & Scheller, F.W. (2001) Bioelectrochemical analysis of neuropathy target esterase activity in blood. *Analytical Biochemistry*, 290(1), 1-9. DOI: 10.1006/abio.2000.4822
29. Makhaeva, G.F., Sigolaeva, L.V., Zhuravleva, L.V., Eremenko, A.V., Kurochkin, I.N., Malygin, V.V., & Richardson, R.J. (2003) Biosensor detection of Neuropathy Target Esterase in whole blood as a biomarker of exposure to neuropathic organophosphorus compounds. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 66, 599-610. DOI: 10.1080/15287390390156317
30. Sokolovskaya, L.G., Sigolaeva, L.V., Eremenko, A.V., Gachok, I.V., Makhaeva, G.F., Strakhova, N.N., Malygin, V.V., Richardson, R.J., & Kurochkin, I.N. (2005) Improved electrochemical analysis of neuropathy target esterase activity by a tyrosinase carbon paste electrode modified by 1-methoxyphenazine methosulfate. *Biotechnology Letters*, 27(16), 1211-1218. DOI: 10.1007/s10529-005-0020-1
31. Makhaeva, G.F., Malygin, V.V., Strakhova, N.N., Sigolaeva, L.V., Sokolovskaya, L.G., Eremenko, A.V., Kurochkin, I.N., & Richardson, R.J. (2007) Biosensor assay of neuropathy target esterase in whole blood as a new approach to OPIDN risk assessment: review of progress. *Human & Experimental Toxicology*, 26(4), 273-282. DOI: 10.1177/0960327106070463
32. Wilson, B.W., & Henderson, J.D. (1992) Blood esterase determinations as markers of exposure. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 128, 55-69.
33. Richardson, R.J. (1995) Assessment of the neurotoxic potential of chlorpyrifos relative to other organophosphorus compounds: a critical review of the literature. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 44(2), 135-165. DOI: 10.1080/15287399509531952
34. Lockridge, O., & Schopfer, L.M. (2006) Biomarkers of organophosphate exposure. In Gupta R.C. (Red.), *Toxicology of Organophosphate & Carbamate Compounds* (pp. 703-711). Burlington: Academic Press.
35. Costa, L.G., Cole, T.B., Jarvik, G.P., & Furlong, C.E. (2003) Functional genomic of the paraoxonase (PON1) polymorphisms: effects on pesticide sensitivity, cardiovascular disease, and drug metabolism. *Annual Review of Medicine*, 54, 371-392. DOI: 10.1146/annurev.med.54.101601.152421
36. Sokolovskaya, L.G., Sigolaeva, L.V., Eremenko, A.V., Kurochkin, I.N., Makhaeva, G.F., Malygin, V.V., Zykova, I.E., Kholstov, V.I., & Zavyalova, N.V. (2004) Family of biosensor analyzers for assessment of "esterase status" of organism. *Russian Chemical Journal*, 1-2(13-14), 21-31.
37. Makhaeva, G., Rudakova, E., Boltneva, N., Sigolaeva, L., Eremenko, A., Kurochkin, I., & Richardson, R. (2009) Blood Esterases as a Complex Biomarker for Exposure to Organophosphorus Compounds. In C. Dishovsky & A. Pivovarov (Eds.), *Counteraction to Chemical and Biological Terrorism in East European Countries* (pp. 177-194): Springer Netherlands.
38. Rudakova, E.V., Boltneva, N.P., & Makhaeva, G.F. (2011) Comparative analysis of esterase activities of human, mouse, and rat blood. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 152(1), 73-75.
39. Kurdyukov, I.D., Shmurak, V.I., Nadeyev, A.D., Voitenko, N.G., Prokofyeva, D.S., & Goncharov, N.V. (2012) "Esterase status"

- of the organism at exposure to toxic substances and pharmaceutical preparations. *Toxicological Reviews* (Russian), 6(117), 6-13.
40. Maroni, M., Colosio, C., Ferioli, A., & Fait, A. (2000) Biological Monitoring of Pesticide Exposure: a review. *Toxicology*, 143(1), 5-118. DOI: 10.1016/s0300-483x(99)00152-3
41. Albert, J.R., & Stearns, S.M. (1974) Delayed neurotoxic potential of a series of alkyl esters of 2, 2-dichlorovinyl phosphoric acid in the chicken. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 29(1), 136.
42. Rudakova, E.V., Makhaeva, G.F., & Sigolaeva, L.V. (2014) Investigation of Mice Blood Neuropathy Target Esterase as Biochemical Marker of Exposure to Neuropathic Organophosphorus Compounds. In J. R. S. C. Dishovsky (Ed.), *Toxicological Problems* (pp. 39-50). Sofia, Bulgaria: Military Publishing House.
43. Makhaeva, G.F., Serebryakova, O.G., Boltneva, N.P., Galenko, T.G., Aksinenko, A.Y., Sokolov, V.B., & Martynov, I.V. (2008) Esterase profile and analysis of structure-inhibitor selectivity relationships for homologous phosphorylated 1-hydroperfluoroisopropanols. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 423(1), 352-357. DOI: 10.1134/s1607672908060094
44. Rudakova, E.V., Makhaeva, G.F., Galenko, T.G., Aksinenko, A.Y., Sokolov, V.B., & Martynov, I.V. (2013) A new selective inhibitor of mouse blood plasma carboxylesterase. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 449, 87-89. DOI: 10.1134/S1607672913020099
45. Sigolaeva, L., Makhaeva, G., Rudakova, E., Boltneva, N., Porus, M., Dubacheva, G., Eremenko, A., Kurochkin, I., & Richardson, R.J. (2010) Biosensor analysis of blood esterases for organophosphorus compounds exposure assessment: Approaches to simultaneous determination of several esterases. *Chemico-Biological Interactions*, 187(1-3), 312-317. DOI: 10.1016/j.cbi.2010.01.028
46. Sigolaeva, L.V., Dubacheva, G.V., Porus, M.V., Eremenko, A.V., Rudakova, E.V., Makhaeva, G.F., Richardson, R.J., & Kurochkin, I.N. (2013) A layer-by-layer tyrosinase biosensor for assay of carboxylesterase and neuropathy target esterase activities in blood. *Analytical Methods*, 5(16), 3872. DOI: 10.1039/c3ay40339d
47. Rudakova, E.V., Serebryakova, O.G., Boltneva, N.P., Galenko, T.G., & Makhaeva, G.F. (2012) A biochemical model in mice for assessment of neuropathic potential of organophosphorus compounds. *Toxicological Reviews* (Russian), 6, 20-24.
48. Makhaeva, G.F., Rudakova, E.V., Sigolaeva, L.V., Kurochkin, I.N., & Richardson, R.J. (2016) Neuropathy target esterase in mouse whole blood as a biomarker of exposure to neuropathic organophosphorus compounds. *Journal of Applied Toxicology*, 36(11), 1468-1475. DOI: 10.1002/jat.3305
49. Makhaeva, G.F., Aksinenko, A.Y., Sokolov, V.B., Serebryakova, O.G., & Richardson, R.J. (2009) Synthesis of organophosphates with fluorine-containing leaving groups as serine esterase inhibitors with potential for Alzheimer disease therapeutics. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 19(19), 5528-5530. DOI: 10.1016/j.bmcl.2009.08.065
50. Makhaeva, G.F., & Malygin, V.V. (1999) A stable preparation of hen brain neuropathy target esterase for rapid biochemical assessment of neurotoxic potential of organophosphates. *Chemico-Biological Interactions*, 119-120, 551-557. DOI: 10.1016/s0009-2797(99)00069-1
51. Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., & Feather-Stone, R.M. (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7, 88-95. DOI: 10.1016/0006-2952(61)90145-9
52. Johnson, M.K. (1977) Improved assay of neurotoxic esterase for screening organophosphates for delayed neurotoxicity potential. *Archives of Toxicology*, 37(2), 113-115. DOI: 10.1007/BF00293860
53. Aldridge, W.N., & Reiner, E. (1969) Acetylcholinesterase. Two types of inhibition by an organophosphorus compound: one the formation of phosphorylated enzyme and the other analogous to inhibition by substrate. *Biochemical Journal*, 115(2), 147-162.
54. Padilla, S., Lassiter, T.L., & Hunter, D. (1999) Neurodegeneration Methods and Protocols. In H. A. T. J. Harry (Ed.), *Methods in Molecular Medicine* (Vol. 22, pp. 237-245). N.J. Totowa: Humana Press Inc.
55. Reiner, E., Bosak, A., & Simeon-Rudolf, V. (2004) Activity of cholinesterases in human whole blood measured with acetylthiocholine as substrate and ethopropazine as selective inhibitor of plasma butyrylcholinesterase. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 55(1), 1-4.
56. Worek, F., Mast, U., Kiderlen, D., Diepold, C., & Eyer, P. (1999) Improved determination of acetylcholinesterase activity in human whole blood. *Clinica Chimica Acta*, 288(1-2), 73-90. DOI: 10.1016/S0009-8981(99)00144-8
57. De Vriese, C., Gregoire, F., Lema-Kisoka, R., Waelbroeck, M., Robberecht, P., & Delpoite, C. (2004) Ghrelin degradation by serum and tissue homogenates: identification of the cleavage sites. *Endocrinology*, 145(11), 4997-5005. DOI: 10.1210/en.2004-0569
58. Huang, T.L., Shiotsuki, T., Uematsu, T., Borhan, B., Li, Q.X., & Hammock, B.D. (1996) Structure-activity relationships for substrates and inhibitors of mammalian liver microsomal carboxylesterases. *Pharmaceutical Research*, 13(10), 1495-1500.
59. Chanda, S.M., Mortensen, S.R., Moser, V.C., & Padilla, S. (1997) Tissue-specific effects of chlorpyrifos on carboxylesterase and cholinesterase activity in adult rats: An *in vitro* and *in vivo* comparison. *Fundamental and Applied Toxicology*, 38, 148-157.
60. Sigolaeva, L.V., Pergushov, D.V., Synatschke, C.V., Wolf, A., Dewald, I., Kurochkin, I.N., Fery, A., & Müller, A.H.E. (2013) Co-assemblies of micelle-forming diblock copolymers and enzymes on graphite substrate for an improved design of biosensor systems. *Soft Matter*, 9(10), 2858-2868. DOI: 10.1039/c2sm27298a

Поступила: 21. 05. 2018.  
Принята к публикации: 21. 08. 2018.

## INVESTIGATION OF THE ESTERASE STATUS AS A COMPLEX BIOMARKER OF EXPOSURE TO ORGANOPHOSPHORUS COMPOUNDS

*G.F. Makhaeva<sup>1\*</sup>, E.V. Rudakova<sup>1</sup>, R.J. Richardson<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Institute of Physiologically Active Compounds of the Russian Academy of Sciences,  
1 Severny proezd, Moscow region, Chernogolovka, 142432 Russia; \*e-mail: gmakh@ipac.ac.ru

<sup>2</sup>Departments of Environmental Health Sciences and Neurology, University of Michigan, Ann Arbor, MI 48109 USA

Development of biomarkers of human exposures to organophosphorus compounds OPCs and their quantification is a vital component of a system of prediction and early diagnostics of OPC-induced diseases. Our study was focused on investigation of esterase status as a complex biomarker of exposure to OPCs and an aid in accurate diagnosis. We suggest that this complex biomarker should be more effective and informative than standard assays of plasma butyrylcholinesterase (BChE), erythrocyte acetylcholinesterase (RBC AChE), and lymphocyte neuropathy target esterase (NTE). It will help: 1) to assess an exposure as such and to confirm the nonexposure of individuals suspected to have been exposed; 2) to determine if the exposure was to agents expected to produce acute and/or delayed neurotoxicity; 3) to perform dosimetry of the exposure, which provides valuable information for medical treatment. To confirm this hypothesis, we have examined the changes in activity of blood AChE, NTE, BChE and carboxylesterase (CaE) 1 h after i.p. administration of increasing doses of three OPCs with different esterase profiles: the known neuropathic compound *O,O*-dipropyl-*O*-dichlorovinyl phosphate ( $C_3H_7O)_2P(O)OCH=CCl_2$  (diPr-DCIVP) as the control compound and two model dialkylphosphates ( $C_2H_5O)_2P(O)OCH(CF_3)_2$  (diEt-PFP) and ( $C_4H_9O)_2P(O)OCH(CF_3)_2$  (diBu-PFP). The esterases assay was performed in hemolysed blood by spectrophotometric (AChE, BChE, CaE) and biosensor (NTE) methods. Analysis of the obtained dose-dependences for blood esterases inhibition showed that blood BChE and CaE were the most sensitive biomarkers, allowing detection of low doses. Inhibition of blood NTE and AChE can be used to assess the likelihood that an exposure to OPC would produce cholinergic and/or delayed neuropathic effects.

**Key words:** acetylcholinesterase (AChE); butyrylcholinesterase (BChE); neuropathy target esterase (NTE); carboxylesterase (CaE); blood; biomarker; organophosphorus compounds (OPC)

### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the NATO Science for Peace and Security Program (grant № Sfp 984082) and by Russian State assignment no. 0090-2017-0019. The authors thank to the colleagues from the Laboratory of molecular toxicology of IPAC RAS O.G. Serebryakova and T.G. Galenko for assistance in toxicological experiments and work with animals.