

УДК 543.51 :615.917

ВОЗМОЖНОСТИ ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ОСТРОГО ОТРАВЛЕНИЯ ВЕЩЕСТВОМ VR И АНТИДОТНОЙ ТЕРАПИИ КАРБОКСИМОМ

Н.Л. Корягина, Е.И. Савельева, А.И. Уколов, Д.С. Прокофьева, Н.С. Хлебникова, Т.И. Орлова, Е.С. Уколова, А.С. Радиллов, Н.В. Гончаров

ФГУП «НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России, 188663, Ленинградская область, Всеволожский район, г.п. Кузьмоловский, Российская Федерация

Исследовано влияние реактиватора холинэстераз карбоксима на возможность определения маркеров VR (О-изобутил-S-(2-диэтиламиноэтил)метилтиофосфоната) в биопробах, полученных в остром эксперименте *in vivo* после отравления крыс в дозе $2 \times 0,4LD_{50}$ с интервалом 1 час. Установлено, что ацетилхолинэстераза (АХЭ) является более чувствительным биомаркером по сравнению с бутирилхолинэстеразой (БХЭ) плазмы крови. Использование карбоксима приводит к реактивации АХЭ в течение 3-х часов после отравления, тогда как в отсутствие терапии реактивация происходит в течение 3-х дней. Регенерация фосфорорганических отравляющих веществ (ФОВ) из состава белковых аддуктов плазмы крови с помощью фторид-иона в условиях эксперимента была возможна в течение 7 дней независимо от применения антидота. Влияние реактиватора на экскрецию продуктов гидролиза VR оказалось значительным. Через сутки после отравления и введения карбоксима О-изобутилметилфосфонат (ИБМФК) был идентифицирован в моче на уровне 17 нг/мл, в то время как в образцах мочи животных, не получавших реактиватор, на уровне 7,4 нг/мл; через трое суток ИБМФК был определен только в моче животных, не получавших антидот, на уровне 1 нг/мл. Также установлено, что содержание свободных и этерифицированных жирных кислот в плазме крови животных, не получавших антидот, становится максимальным на 7 сутки после отравления и, таким образом, может дополнить комплекс токсикодинамических показателей отравления VR.

Ключевые слова: химико-токсикологический анализ, фосфорорганические отравляющие вещества, вещество VR, маркеры, хроматомасс-спектрометрия, антидотная терапия.

Корягина Надежда Леонидовна (Koryagina Nadezhda Leonidovna), кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории аналитической токсикологии ФГУП «НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России, 188663, Ленинградская область, Всеволожский район, г.п. Кузьмоловский, Российская Федерация, koryagina@rihophe.ru

Савельева Елена Игоревна (Savelieva Elena Igorevna), доктор химических наук, заведующий лабораторией аналитической токсикологии ФГУП «НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России, 188663, Ленинградская область, Всеволожский район, г.п. Кузьмоловский, Российская Федерация, savelieva@rihophe.ru

Уколов Антон Игоревич (Ukolov Anton Igorevich), кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории аналитической токсикологии ФГУП «НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России, 188663, Ленинградская область, Всеволожский район, г.п. Кузьмоловский, Российская Федерация, antonukolov@gmail.com

Прокофьева Дарья Станиславовна (Prokofieva Darya Stanislavovna), кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной токсикологии и экспериментальной терапии ФГУП «НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России, 188663, Ленинградская область, Всеволожский район, г.п. Кузьмоловский, Российская Федерация, darja-p1@yandex.ru

Хлебникова Наталия Семеновна (Khlebnikova Nataliya Semenovna), кандидат химических наук, руководитель международного отдела, старший научный сотрудник лаборатории общей токсикологии и гигиенического нормирования ФГУП «НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России, 188663, Ленинградская область, Всеволожский район, г.п. Кузьмоловский, Российская Федерация, khlebnikova@rihophe.ru

Уколова Елена Сергеевна (Ukolova Elena Sergeevna), кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории аналитической токсикологии ФГУП «НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России, 188663, Ленинградская область, Всеволожский район, г.п. Кузьмоловский, Российская Федерация

Орлова Татьяна Игоревна (Orlova Tatiana Igorevna), научный сотрудник лаборатории аналитической токсикологии ФГУП «НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России, 188663, Ленинградская область, Всеволожский район, г.п. Кузьмоловский, Российская Федерация

Радиллов Андрей Станиславович (Radilov Andrey Stanislavovich), доктор медицинских наук, профессор, заместитель директора по научной работе, заведующий отделом токсикологии ФГУП «НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России, 188663, Ленинградская область, Всеволожский район, г.п. Кузьмоловский, Российская Федерация, radilov@rihophe.ru

Гончаров Николай Васильевич (Goncharov Nikolay Vasilievich), доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории аналитической токсикологии ФГУП «НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России, 188663, Ленинградская область, Всеволожский район, г.п. Кузьмоловский, Российская Федерация, ngoncharov@gmail.com

Введение. Фосфорорганические отравляющие вещества (ФОВ) являются нервно-паралитическими ядами. Основным механизмом токсического воздействия ФОВ заключается в ингибировании холинэстераз (ХЭ), осуществляющих гидролиз ацетилхолина. Вещества группы V: О-этил-S-(2-диизопропиламиноэтил)метилтиофосфонат, VX, CAS: 50782-69-9 и О-изобутил-S-(2-диэтиламиноэтил)метилтиофосфонат, VR, CAS: 159939-87-4, являются наиболее токсичными из всех химических соединений, созданных человеком при разработке химического оружия. Структурные формулы приведены на рисунке 1.

Возможность установления факта отравления ФОВ методами химико-токсикологического анализа определяется реальными концентрациями маркеров этих ФОВ в биопробах на момент исследования и возможностями методики их достоверной идентификации. Методами биохимического анализа регистрируют снижение каталитической активности ХЭ крови [1,2,3], методами химического анализа определяют ксенометаболиты – продукты метаболизма ФОВ (низкомолекулярные продукты гидролиза, белковые аддукты) [4,5,6,7]. При оценке метаболических последствий отравлений фиксируют изменения концентраций биогенных веществ, например, маркеров метаболизма липидов [8].

В случае поражения ФОВ антидотная терапия (введение холинэстеразы, реактиватора или их комбинации), с большой вероятностью, будет проведено раньше, чем будут отобраны биопробы для анализа. Антидотами при поражении ФОВ обычно являются представители двух групп веществ: холинэстеразы и реактиваторы ХЭ [9]. Наиболее известный препарат первой группы – атропин. В больших дозах он обладает не только периферическим, но и центральным М-холинэстеразным действием, а также проявляет дофаминоблокирующий эффект [10]. В качестве реактиваторов ХЭ применяют дипироксим, токсогонин, обидоксим и др. [11]. Принцип реактивации заключается в разрыве химической связи между ФОВ и ХЭ, в результате чего восстанавливается структура ХЭ и её функция. Кроме того, реактиваторы ХЭ обладают Н-холинэстеразными свойствами, что обосновывает их применение в сочетании с М-холинэстеразами [12]. Антидотная терапия может изменить показатели токсикокинетики ФОВ и их метаболитов, что необходимо учитывать при проведении химико-токсикологического анализа и интерпретации его результатов.

Целью настоящего исследования являлась оценка влияния антидотной терапии на возможности химико-токсикологического анализа ксенометаболитов и биогенных маркеров

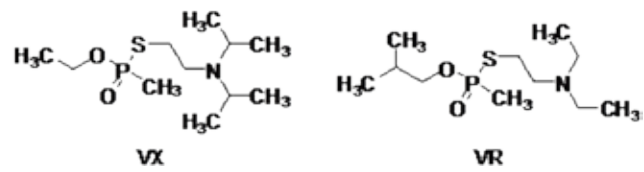


Рис. 1. Структурные формулы фосфорорганических отравляющих веществ группы V

воздействия ФОВ при моделировании острого отравления животных (крыс) веществом VR с применением реактиватора карбоксима. В качестве маркеров рассматривали: 1) активность ХЭ крови; 2) О-изобутилметилфторфосфонат (VR-G) – фторпроизводное вещества VR, регенерированного из белковых аддуктов с помощью фторид-иона в плазме крови; 3) О-изобутилметилфосфонат – продукт гидролиза вещества VR в моче; 4) биогенные компоненты плазмы крови – свободные (СЖК) и этерифицированные жирные кислоты (ЭЖК).

Материалы и методы исследования.

ГСО и другие материалы.

VR (ГОСТ 8249-2004), карбоксим (раствор для внутримышечного введения 150 мг/мл, V03AB), О-изобутилметилфосфонат и его дейтерированный аналог (синтезирован в НИИ химии Санкт-Петербургского Государственного университета), ацетонитрил (ТУ 6-09-5497-91), ацетат натрия (ГОСТ 199-78), фильтры Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Units (10k, Millipore), муравьиная кислота (Fluka, кат. № 56302), калий фтористый 2-водный (CAS 7789-23-3, ГОСТ 20848-75), ацетат натрия (ГОСТ 199-78), уксусная кислота (ГОСТ 19814-74), дихлорметан (Supelco, кат. № 1.06044.2500), этилацетат (ГОСТ 22300-76), 10 мМ натрий-калиевый фосфатный буферный раствор (137 мМ NaCl и 2,7 мМ KCl), pH 7.4 (ФБ). Картриджи для твердофазной экстракции (ТФЭ) – OASIS HLB, 60 мг (Waters, кат. № WAT094226) и Supelclean LC-18, 500 мг (Supelco, кат. № 57012); многоканальный вакуумный коллектор для ТФЭ (Supelco, кат. № 57030-U), вортекс (SkyLine, ELM1), ультразвуковая ванна (Elmasonic S30H, ELMA), термостатируемый шейкер (SkyLine ST-3L, ELM1).

Объекты анализа

Образцы плазмы крови и мочи лабораторных животных, полученные в эксперименте *in vivo*. Условия содержания экспериментальных животных соответствовали нормативному документу «Правила лабораторной практики в Российской Федерации (GLP)» (утв. Приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации 19.06.2003 N 267).

Описание токсикологического эксперимента

В эксперименте были использованы 2 группы белых беспородных крыс со средней массой тела 270 ± 24 г по 12 особей в каждой. Животным 1-й группы вводили VR подкожно, дважды по 0.4 ЛД₅₀ с интервалом 1 час (суммарная введенная доза составила $9,6$ мкг/кг); животным 2-й группы вводили воду (контроль). Сразу после первого введения VR половине животных каждой группы был введен подкожно карбоксим в дозе 10 мг/кг из расчета 100 мкл/100 г веса тела. Отбор проб крови производили через 3 часа, 1, 3, 7 и 30 суток, отбор мочи – через 1, 3 и 7 суток после начала токсикологического эксперимента.

Оборудование и условия проведения инструментального анализа

1. Определение активности АХЭ и БХЭ биохимическими методами

1.1 Выделение мембран эритроцитов из цельной замороженной крови

Образцы цельной крови перед анализом размораживали при $+4^\circ\text{C}$. К аликвоте цельной крови объемом 0.25 см³ добавляли 1 см³ ФБ. Полученную взвесь суспендировали и центрифугировали в течение 30 мин при $20\ 000$ g и $+4^\circ\text{C}$.

Аликвоту надосадочной жидкости объемом $0,2$ см³ вносили в лунки 96-луночного планшета в тройном повторе для каждой пробы. Измерения абсорбции проводили при длине волны 540 нм (максимум поглощения гемоглобина).

Для отмывки мембран эритроцитов к осадку добавляли $1,0$ см³ ФБ. Образец подвергали ультразвуковой (УЗ) обработке в течение 30 мин в режиме непрерывного излучения после чего перемешивали на вортексе в течение 5 мин. Надосадочную жидкость отбрасывали, и к осадку вновь добавляли ФБ. Процедуру отмывки повторяли до тех пор, пока надосадочная жидкость не становилась практически бесцветной. Полученный осадок суспендировали в $1,0$ мл ФБ в УЗ-ванне в течение 10 мин.

1.2 Измерение активности АХЭ мембран эритроцитов

Аликвоту суспензии объемом $0,2$ см³ помещали в лунки планшета в тройном повторе для каждой пробы. В качестве холостой пробы использовали ФБ. Планшет нагревали 3 мин на шейкере при 37°C . В пробы вносили по $0,08$ см³ проявочной смеси, состоящей из 9 объемных частей раствора $5,5'$ -дитиобис-(2-нитробензойной кислоты) в ФБ (0.8 мг/см³) и одной объемной части раствора ацетилтиохолина в ФБ (20 мг/см³). Планшет помещали в планшетный фотометр, поддерживающий температуру 37°C , на 2 мин, после чего проводили считывание абсорбции опытных проб против холостой пробы при длине волны 405 нм в кинетическом режиме. Было выполнено два измерения с интервалом в 10 мин.

Из значения абсорбции опытных проб второго считывания вычитали соответствующие им значения абсорбции опытных проб первого считывания. За 100% активность АХЭ принимали активность АХЭ в пробах, отобранных у животных контрольной группы.

1.3 Определение активности БХЭ в плазме крови

Образцы плазмы крови разбавляли в 20 раз с помощью ФБ и встряхивали в течение 5 мин в устройстве для встряхивания проб. Аликвоту образца объемом 0.16 см³ помещали в лунки 96-луночного планшета в тройном повторе для каждой пробы. В качестве холостой пробы использовали ФБ. Измерения проводили в условиях, описанных в п. 1.2.

1.4 Статистическая обработка данных

Статистическую обработку полученных данных ($n \geq 6$), выполняли с помощью программного обеспечения GraphPad Prizm 5.0. Перед анализом данных проводили проверку нормальности их распределения (тест Колмогорова–Смирнова). Поскольку данные подчинялись нормальному распределению, для дальнейшей обработки использовали параметрический однофакторный дисперсионный анализ. Для сравнения экспериментальных данных с контрольными значениями использовали тест Dunnett. Критический уровень значимости (P) при проверке статистических гипотез принимали равным 0.05 . В случае небольших выборок ($n \leq 5$) для представления данных использовали программу Microsoft Excel. Данные на рисунках представлены в виде $\text{среднее} \pm \text{стандартное отклонение}$.

2. Определение фторпроизводного VR в образцах плазмы крови проводили методом газовой хроматографии (ГХ) с тандемной масс-спектрометрией (МС/МС) [6, 13], с использованием газового хроматографа модель 7890 А с масс-селективным детектором с тройным квадруполом («Agilent», модель 7000); программное обеспечение Masshunter (условия ГХ-МС/МС анализа: температура испарителя 250°C ; ввод пробы без деления потока (1.0 мин); температурная программа: 40°C (1 мин) – $10^\circ\text{C}/\text{мин}$ – 250°C (2 мин), post-run 280°C (5 мин); газ-носитель гелий, расход через колонку 1 см³/мин; температура интерфейса 280°C ; температура источника ионов 150°C ; температура масс-фильтра 150°C ; скорость потока газов в ячейку столкновений азота 1.5 см³/мин; гелия 2.25 см³/мин; ток эмиссии на филаменте 200 мкА; напряжение на умножителе (Gain Factor) 10; время задержки растворителя 3 мин. Детектирование осуществлялось в режиме мониторинга множественных реакций: $99 \rightarrow 81$ (16 эВ); $112 \rightarrow 82$ (5 эВ), $112 \rightarrow 67$ (15 эВ). Капиллярная кварцевая колонка HP-5MS – $60\text{ м} \times 0,25\text{ мм} \times 0,25\text{ мкм}$ с привитой неподвижной фазой

(5% фенил 95% диметилполисилоксан) (Supelco, код по каталогу 19091S-436).

Подготовка проб плазмы крови к анализу

В пластиковую пробирку (эппендорф) вместимостью 2 мл, содержащую 0.5 мл плазмы крови, добавляли 1.2 мл 0.2 М ацетатного буфера (рН 3.5) и 0.2 мл 5.25 М раствора фтористого калия. Пробу выдерживали в течение 30 минут в термостате при $32 \pm 2^\circ\text{C}$, центрифугировали 15 мин при 14000 об/мин. Сорбент Oasis HLB (60 мг) кондиционировали 1 мл метанола и 1 мл деионизованной воды. Подготовленный образец биопробы пропускали через сорбент со скоростью 1 капля/с. Затем сорбент сушили под слабым вакуумом в течение 15 мин. Элюирование целевого вещества проводили хлористым метилом (3 0.5 мл). Элюат собирали в виалу с коническим дном вместимостью 2,0 мл через воронку с сульфатом натрия и затем концентрировали в токе азота до 100 мкл. 0,001 мл экстракта подвергали ГХ анализу.

3. Определение алкилметилфосфоновых кислот в моче проводили методом жидкостной хроматографии (ЖХ) с тандемной масс-спектрометрией (МС/МС) в режиме высокого разрешения [14] с использованием жидкостного хроматографа модель Accela 1250 и масс-селективного детектора Orbitrap LTQ Velos (электроспрей HESI – II, режим отрицательной ионизации), «Thermo Scientific». Температура распылителя – 300°C , температура капилляра – 370°C , скорость потока защитного газа – 50 psi, скорость потока вспомогательного газа – 17 у.ед., напряжение на капилляре – плюс 3000 В. Состав подвижной фазы: компонент А – водный раствор формиата аммония с концентрацией 10 ммоль-дм³; компонент Б – раствор формиата аммония с концентрацией 10 ммоль-дм³ в метаноле (0 мин – 5% компонента Б (Б); 5 мин – 5% Б; 12 мин – 70% Б; 20 мин – 80% Б; 20,01-5% Б; 32 мин – 5% Б). Детектирование осуществляется при высоком разрешении (30000), тип диссоциации – CID: ИбМФК–151.053 → 94.990 (35 ev); d3 ИбМФК 154.053 → 98.009 (35 ev).

Подготовка проб мочи к ВЭЖХ-МС/МС анализу. В образец мочи объемом 1.0 см³ вносили 0.005 см³ водного раствора d3-ИбМФК с концентрацией 0.005 мг-см³. Образец центрифугировали в течение 10 мин при 2000 g, фильтровали через фильтр Supelco Iso – Disc Filters N – 13 – 4, Nylon 13 мм × 0.45 мкм и разбавляли деионизованной водой в соотношении 1:3. Объем пробы для анализа 0.005 см³.

4. Определение свободных и этерифицированных жирных кислот в плазме крови проводили двухстадийным методом [15, 16]. Первая стадия – переэтерификация ЭЖК раствором метилата калия в метаноле, вторая – экстрактивное алки-

лирование СЖК и измерение концентраций метиловых эфиров методом ГХ с масс-селективным детектированием (газовый хроматограф Agilent 7890А с масс-селективным детектором Agilent 5975 и капиллярной колонкой HP-5MS (30м × 250мкм × 0.25мкм)).

Результаты и обсуждение.

Определение активности холинэстераз

Традиционно для установления факта воздействия ФОВ используют фотоколориметрические методы анализа, позволяющие определить степень ингибирования АХЭ, присутствующей на поверхности мембран эритроцитов, или родственного ей фермента БХЭ, который демонстрирует достаточно высокую активность в сыворотке и плазме крови. Подобные методы ежедневно используются в мониторинге здоровья персонала, контактирующего с ФОВ в производственных условиях.

На рисунках 2 – 3 представлены данные по изменению активности АХЭ мембран эритроцитов и БХЭ плазмы крови после отравления животных VR в дозе $2 \times 0,4 \text{ ПД}_{50}$ в условиях антидотной терапии и без нее.

Статистически значимые отличия в активности БХЭ плазмы крови подопытных животных по сравнению с контрольными значениями были установлены только для временного интервала 3 часа. Антидотная терапия практически не оказала влияния на значение данного биохимического показателя в более отдаленные сроки. Предел ретроспективных возможностей метода определения активности АХЭ мембран эритроцитов после применения карбоксима также составляет 3 часа. В отличие от БХЭ уровень активности АХЭ очень чувствителен к использованию антидота. В отсутствие реактиватора ретроспективная возможность метода составляет 3 дня с момента отравления VR (рис. 2). Таким образом, при исследовании эффективности реактиваторов активность АХЭ мембран эритроцитов является весьма информативным показателем, позволившим подтвердить эффективность карбоксима в антидотной терапии отравлений VR.

Определение алкилметилфосфоновых кислот

Определение низкомолекулярных продуктов гидролиза ФОВ – алкилметилфосфоновых кислот (АМФК) в моче является одним из наиболее простых способов установления факта воздействия ФОВ на организм [17]. О-изобутилметилфосфоновая кислота (ИбМФК) является маркером VR, тогда как метилфосфоновая кислота (МФК) – универсальный маркер всех ФОВ [18], рисунок 4.

Экскреция с мочой – основной путь выведения метаболитов ФОВ из организма. Гораздо меньшее их количество выводится с калом или

образует ковалентные связи с белками. По данным [19], 90% от общего количества метаболитов ФОВ выводится в первые 48 – 72 ч после отравления. Исследование биожидкостей жертв террористических атак (зарин, VX) и экспонированных ФОВ лабораторных животных [20, 21] показало, что максимальный уровень экскреции МФК достигается через 10–18 часов после воздействия [22].

Таблица 1

Результаты определения (нг/мл) ИБМФК в образцах мочи, полученных после отравления крыс VR в дозе $2 \times 0.4 \text{ ЛД}_{50}$ ($\delta \pm 25\%$ при $P = 0.95$)

Время после интоксикации, сутки	(n=2)	
	VR	VR + карбоксим
1	7.4	17.0
3	1.0	<0.5
7	<0.5	<0.5

Определение ИБМФК в образцах мочи проводили методом ВЭЖХ-МС/МС в режиме высокого разрешения (ВР). Предел обнаружения ИБМФК составляет $0.5 \text{ нг} \cdot \text{см}^3$ [14], таблица 1.

Результаты определения ИБМФК в образцах мочи, полученных после отравления крыс VR в дозе $2 \times 0.4 \text{ ЛД}_{50}$

Через сутки после отравления и введения карбоксима концентрация ИБМФК в пробах мочи животных была в 2,5 раза выше по сравнению с образцами мочи от животных, которым после отравления не вводили реактиватор. Реактивированный карбоксим из состава биоконъюгатов VR гидролизует и выводится с мочой в быстрой фазе элиминации.

Определение О-изобутилметилфторфосфоната, регенерированного из состава белковых аддуктов с помощью фторид-иона

Реактивированные из состава биоконъюгатов плазмы крови *ex vivo* ФОВ используются анализаторами в качестве маркеров воздействия. Первая успешная попытка ретроспективного анализа в целях установления факта воздействия ФОВ на организм путем реактивирования БХЭ была предпринята Полхиусом с соавторами [23]. После реактивирования зарин был обнаружен в сыворотке крови 10-ти из 11-ти жертв террористической атаки секты АУМ Синрике в Токийском метро и в 2-х из 7-ми образцов сыворотки крови жертв трагедии в Мацумото. Высокий потенциал метода реактивирования, реализованного в процедуре, описанной в работе [24], для установления факта воздействия ФОВ был продемонстрирован в работе [25] на примере анализа образцов плазмы крови сотрудника лаборатории, который случайно подвергся ингаляционному воздействию VX в концентрации порядка $0,026 \text{ мкг/м}^3$ (норматив для рабочей зоны – $0,001 \text{ мкг/м}^3$). Отравление первоначально было диагностировано по клиническим симптомам (миоз, затрудненное дыхание и др.), в связи с чем была произведена оксимная терапия (600 мг пралидоксима и 2 мг атропина). Анализ активности ХЭ крови не выявил существенного угнетения,

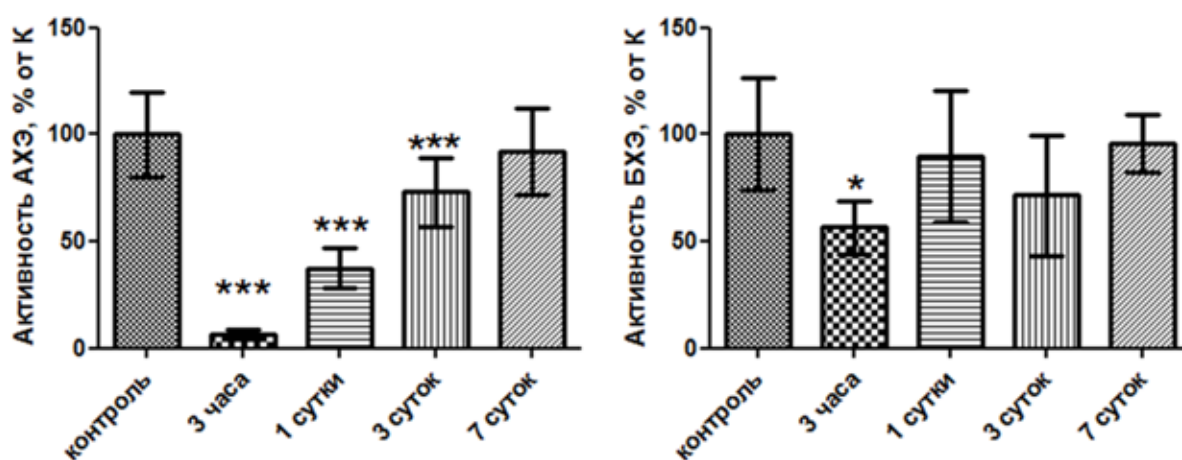


Рис. 2. Активность АХЭ мембран эритроцитов и БХЭ плазмы крови крыс на разных сроках после отравления VR ($2 \times 0.4 \text{ ЛД}_{50}$), $n=6$

а через 24 часа уже никаких клинических проявлений не было. В то же время, в образцах плазмы крови, обработанных в кислой среде фторидом натрия, был идентифицирован О-этилметилфторфосфонат (VX-G) в концентрациях от 81.4 пг/мл

в первый день после отравления до 6.9 пг/мл на 27-й день (предел определения метода – 5,5 пг/мл VX-G), в образцах эритроцитов – от 220 пг/мл в первый день до 97 пг/мл на 27-й день после экспозиции [26]. С учетом того, что концентрация БХЭ в плазме крови человека составляет около 80 нМ, следует, что метод позволяет подтверждать воздействие низких доз VX, поскольку маркер надежно детектируется при уровне ингибирования БХЭ > 0,05%.

Влияние антидотной терапии карбоксимом на возможность подтверждения интоксикации VR путем определения VR-G – продукта его реактивирования фторид-ионом из биоконъюгатов плазмы крови, было исследовано в эксперименте. На рисунке 5 представлены результаты определения VR-G в плазме крови после подкожного введения раствора VR в дозе 9,6 мкг/кг ($2 \times 0,4 \text{LD}_{50}$) без применения и с применением реактиватора карбоксима.

Через 24 ч после интоксикации VR содержание VR-G в плазме крови животных, получавших карбоксим, примерно в 2 раза ниже в сравнении с образцами плазмы крови животных без терапии. Через 3 дня и 7 дней после интоксикации отличий между двумя группами животных не выявлено; уровень VR-G, регенерированного из плазмы крови животных обеих групп, составил 0,3 нг/мл. В образцах плазмы крови, полученных через 30 дней после интоксикации, VR-G не был обнаружен.

Определение свободных и этерифицированных жирных кислот

Биомаркерами в токсикологии считаются показатели токсикодинамики (физиологические, биохимические, иммунологические и др.), изменение которых во времени является следствием воздействия токсиканта на организм [27]. С помощью биомаркеров можно проводить количественную оценку реакции организма на внешнее воздействие [28]. С целью выделения именно этого аспекта биомаркеров, в 2001 г. согласительная комиссия Национального института здоровья США определила смысл термина «биомаркер» как показатель (признак), который можно объективно измерить (т.е. количественно охарактер-

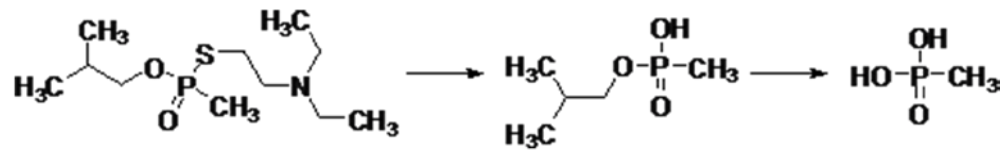


Рис. 3. Активность АХЭ мембран эритроцитов и БХЭ плазмы крови крыс на разных сроках после отравления VR ($2 \times 0,4 \text{LD}_{50}$) с применением реактиватора карбоксима, n=6

ризовать) и который может служить индикатором нормального или патологического течения биологических процессов, либо индикатором ответа на фармакологическое или иное вмешательство. Многие биомаркеры имеют эндогенную природу и служат для оценки динамики изменения состояния живого организма, в отличие от кинетических показателей ксенометаболитов, характеризующих судьбу того или иного ксенобиотика в организме. Токсикодинамические индикаторы отравления, в том числе отравления ФОВ, проявляются, как правило, на более поздних сроках по сравнению с токсикокинетическими индикаторами [29]. В связи с этим в токсикологии все больше внимания уделяется поиску взаимосвязей между кинетическими и динамическими показателями, т.е. между химическими и биологическими маркерами, и построению соответствующих моделей [30,31,32]. Ранее мы исследовали токсикодинамику интоксикации фтор- и фосфорорганическими соединениями, используя при этом методы электрофизиологии, лабораторной и клинической биохимии, гематологии, гемостазиологии и MALDI-масс-спектрометрии [33-39]. С развитием новых технологий химического анализа стало возможным использовать методы хроматомасс-спектрометрии для оценки метаболических расстройств по изменению уровня биогенных органических кислот (гидрокси-, кето-, amino- и поликислот) [40 – 44]. В настоящей работе мы проследили динамику тридцати жирных кислот (ЖК) с длиной цепи C11-C24 в плазме крови при острой интоксикации крыс VR. Изменения концентраций индивидуальных ЖК в образцах плазмы крови животных, отравленных ФОВ с применением и без применения антидотной терапии, самостоятельного диагностического значения не имеют. В то же время, было выявлено статистически значимое увеличение суммарных концентраций этерифицированных (на 30%) и свободных форм ЖК (на 81%) в плазме крови через неделю после введения VR в дозе $2 \times 0,4 \text{LD}_{50}$, рисунки 6 и 7.

Через 3 часа наблюдается достоверное ($P < 0,05$) повышение уровня СЖК на 36%, через 24 ч и суммарная концентрация СЖК снижается до уровня

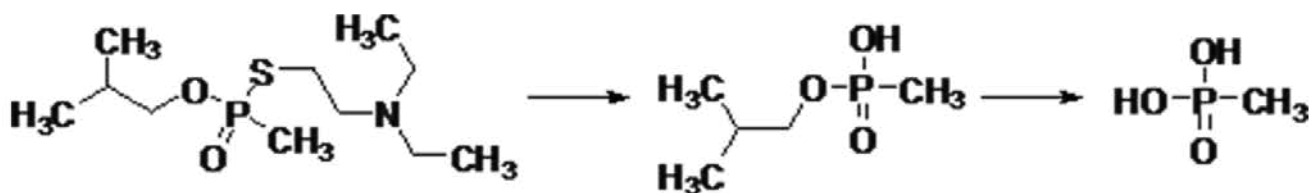


Рис. 4. Схема образования продуктов гидролиза VR

контрольной группы, а затем наблюдается постепенный рост; через 7 дней уровни СЖК превышают соответствующие уровни в контрольной группе на 81% ($P < 0,05$). Терапия карбоксимом изменяет динамику метаболизма липидов: в период 0–72 ч уровень СЖК достоверно ($P < 0,05$) повышен на 18–43% (максимум через 3 ч), однако через 7 дней снижается до нормы. Динамика ЭЖК в целом соответствует динамике СЖК.

Заключение. Сравнительная токсикокинетика и токсикодинамика различных ФОВ, а также эффективность антидотной терапии зависят от ряда факторов, среди которых можно отметить молярное количество эквитоксических доз ФОВ, их физико-химические характеристики (коэффициент распределения, размеры молекул, заряд и др.), особенности транспорта и взаимодействия с вторичными мишенями, «старение» ковалентных аддуктов [45]. Хотя V-газы обладают мак-

симальной токсичностью среди ФОВ, аддукты этих соединений практически не «стаеют» и отличаются довольно высокой спонтанной реактивацией, а реактивация АХЭ оксимами гораздо эффективнее при воздействии веществ группы V, по сравнению с заринем и зоманом [46]. Возможности химических методов ретроспективного анализа при регенерации ФОВ из состава белковых аддуктов плазмы крови крыс с помощью фторид-иона существенно выше по сравнению с определением продуктов гидролиза ФОВ в моче и составили 7 дней при отравлении VR в дозе $2 \times 0,4 \text{LD}_{50}$ в нашем эксперименте, но могут быть продлены при дальнейшей оптимизации процедуры.

Что касается токсикодинамических показателей, АХЭ – более чувствительный биомаркер по сравнению с БХЭ плазмы крови крыс при интоксикации VR. Однако использование реакти-

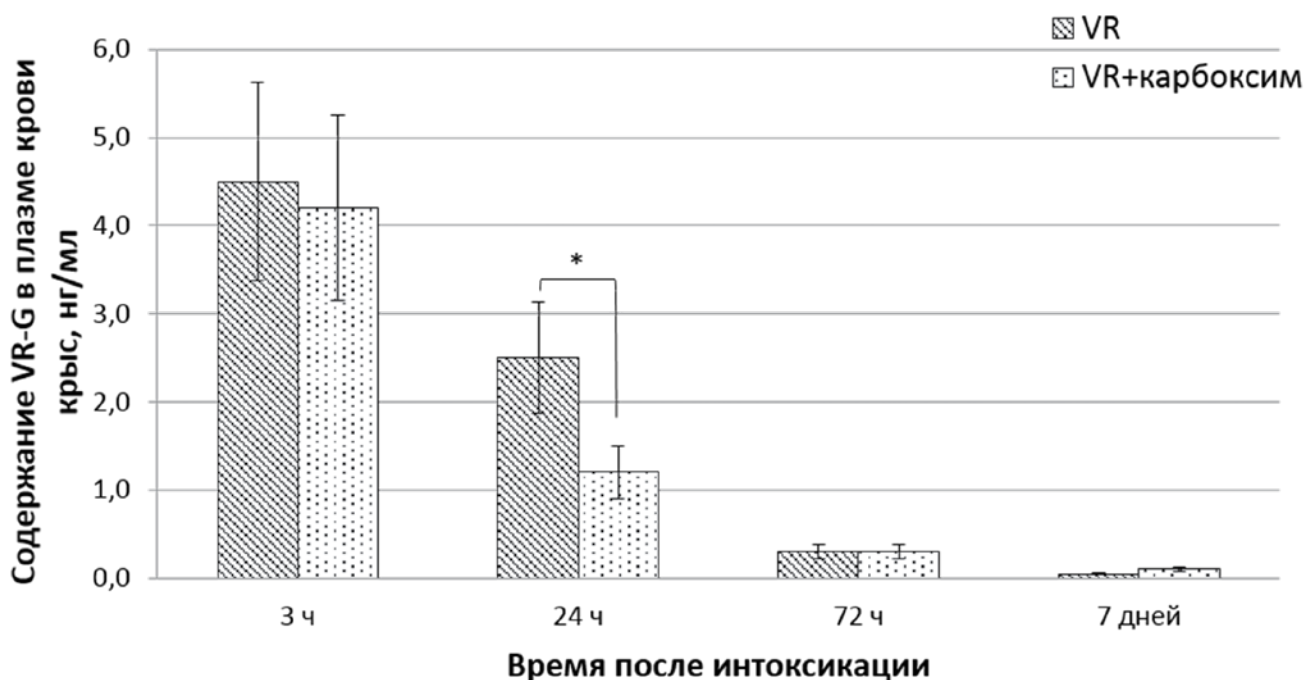


Рис. 5. Динамика VR-G в плазме крови после регенерации фторид-ионом при отравлении VR в дозе $9,6 \text{ мкг/кг}$ ($2 \times 0,4 \text{LD}_{50}$) без терапии и с применением реактиватора карбоксима. Знаком «*» отмечены статистически значимые изменения ($P < 0,05$)

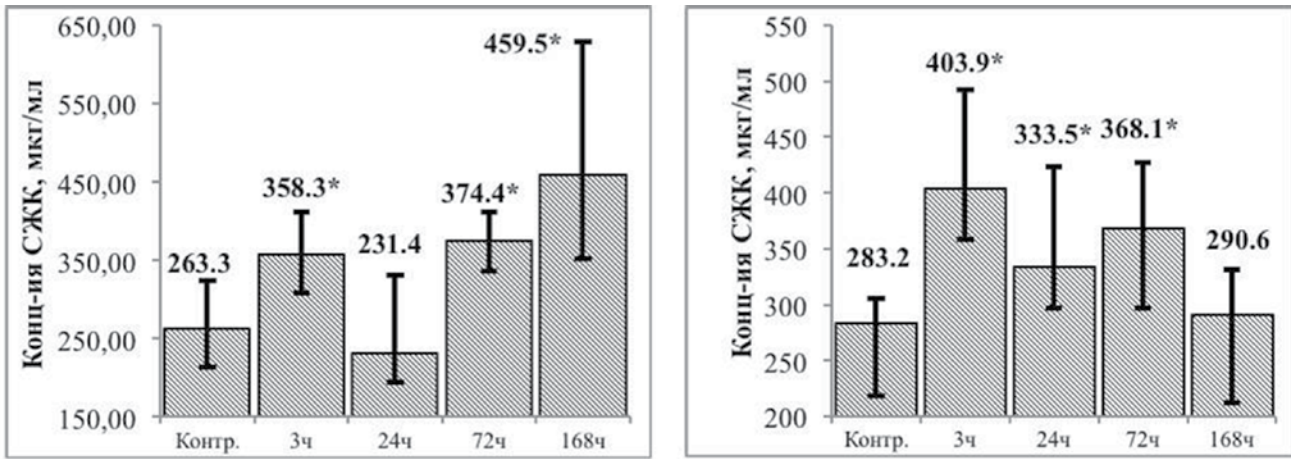


Рис. 6. Изменение суммарного содержания СЖК после отравления VR в дозе $2 \times 0.4LD_{50}$ без терапии (слева) и совместно с карбоксимом (справа); $n=6$
 Знаком «*» отмечены статистически значимые изменения ($P < 0,05$)

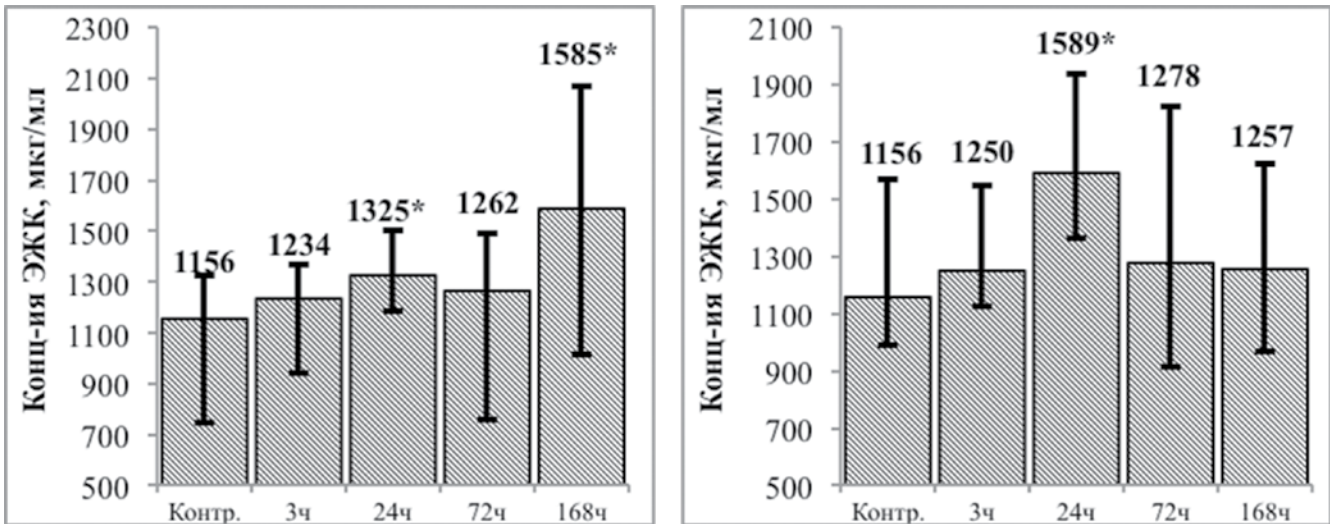


Рис. 7. Изменение суммарного содержания ЭЖК после отравления VR в дозе $2 \times 0.4LD_{50}$ без терапии (слева) и совместно с карбоксимом (справа); $n=6$
 Знаком «*» отмечены статистически значимые изменения ($P < 0,05$)

ватора (карбоксима) нивелирует различия чувствительности двух биохимических методов, уменьшая временной интервал ретроспективной диагностики до 3-х часов. При интерпретации полученных данных следует иметь в виду, что карбоксилэстеразы (КЭ) имеют широкую субстратную специфичность и являются мишенями ФОВ. Наибольшая активность КЭ обнаружена в тонком кишечнике, печени, моноцитах/макрофагах, а грызуны отличаются высокой активностью КЭ в плазме крови [47,48]. Ранее было установлено, что степень ингибирования КЭ *in vivo* эквитоксическими дозами ФОВ прямо пропорциональна отношению бимолекулярных констант скорости ингибирования k_i для КЭ и АХЭ и, следовательно, обратно пропорциональна токсичности ФОВ [49]. Вещества группы V являют-

ся исключением из этой закономерности, хорошо взаимодействуя как с АХЭ, так и с КЭ. Возможно, высокая липофильность VR предопределяет его взаимодействие с более гидрофобными мишенями (Садлоу 1 сайт альбумина) [50,51,52], что способствует эффективному транспорту токсиканта к приоритетным мишеням (АХЭ).

Измерение концентраций СЖК и ЭЖК в плазме крови может дополнить комплекс показателей при отравлении ФОВ, причем для ретроспективной диагностики в течение трех суток после отравления факт применения антидотной терапии оксимами значения не имеет. В дальнейшей оценке, в качестве патогномичного признака отравления VR, в первую очередь при нелеченой интоксикации, необходимо измерение СЖК и ЭЖК в отставленные сроки (более 3 суток).

Измерение концентраций СЖК и ЭЖК в плазме крови может позволить расширить арсенал средств исследования детоксикационных возможностей организма, адаптационных реакций и гомеостаза, позволит существенно повысить надежность диагностики, а также получить дополнительные сведения о тяжести последствий и патогенезе отравления.

Благодарности: Авторы выражают глубокую признательность канд.мед.наук Бельтюкову П.П. за участие в работе, канд.хим.наук Ко-

пейкину В.А. за проведение подтверждающего анализа методом ГХ-МС высокого разрешения, канд.биол.наук Каракашеву Г.В. за реализацию метода ВЭЖХ-МС/МС, канд.биол.наук Войтенко Н.Г. за участие в проведении токсикологического эксперимента на лабораторных животных, инженеру Конева В.Ю. за подготовку проб к анализу.

Работа выполнена в рамках государственного контракта по заказу ФМБА России.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Worek F., Thiermann H., Szinicz L., Eyer P. Kinetic analysis of interactions between human acetylcholinesterase, structurally different organophosphorus compounds and oximes. *Biochem. Pharmacol.* 2004; 68: 2237-2248.
2. Prokofieva D.S., Voitenko N.G., Gustyleva L.K., Babakov V.N., Savileva E.I., Jenkins R.O., Goncharov N.V. Microplate spectroscopic methods for determination of the organophosphate soman // *J. Environ. Monit.* 2010; 12(6): 1349-54.
3. Prokofieva DS, Jenkins RO, Goncharov NV. Microplate biochemical determination of Russian VX: Influence of admixtures and avoidance of false negative results. *Anal Biochem.* 2012; 424(2):108-13.
4. Краснов И.А., Подольская Е.П., Гончаров Н.В., Бабанов В.Н., Глашкина Л.М., Ермолаева Е.Е., Дубровский Я.А., Прокофьева Д.С., Войтенко Н.Г., Смолихина Т.И., Поляков Н.Б., Радилов А.С., Краснов Н.В. Изменения спектра производных фибриноленида в плазме крови при действии О-изобутил-S-(2-дизитиламиноэтил)метилтиофосфоната. Научное приборостроение. 2008; 18(4): 29-36.
5. Бабанов В.Н., Подольская Е.П., Гончаров Н.В., Глашкина Л.М., Краснов И.А., Поляков Н.Б., Войтенко Н.Г., Прокофьева Д.С., Краснов Н.В., А.С. Радилов. Новые маркеры интоксикации фосфорорганическими соединениями в пептидной фракции плазмы крови крыс. *Токсикологический вестник.* 2010; 2: 31-38.
6. Корягина Н.Л., Савельева Е.И., Хлебникова Н.С., Копейкин В.А., Конева В.Ю., Радилов А.С. Особенности анализа фосфорорганических отравляющих веществ, реактивированных из состава аддуктов с белками крови при установлении факта воздействия химического оружия. *Токсикологический вестник.* 2014; 4: 39-46.
7. Black R. M. Historical and perspectives of bioanalytical methods for chemical warfare // *J. of chromatography B.* 2010; 878: 1207-1215.
8. Уколов А.И., Орлова Т.И., Савельева Е.И., Радилов А.С., Гончаров Н.В. Изменения профилей жирных кислот плазмы крови крыс при введении сублетальных количеств фосфорорганических отравляющих веществ. *Токсикологический вестник.* 2015; 132(3): 2-11.
9. Worek F., Thiermann H., Szinicz L., Eyer P. Kinetic analysis of interactions between human acetylcholinesterase, structurally different organophosphorus compounds and oximes // *Biochem. Pharmacol.* 2004; 68: 2237-2248.
10. Юдин М. А., Быков В. Н., Никифоров А. С., Сарана М. А. Особенности проявления нехолинергического действия блокаторов центральных мускариновых рецепторов. *Токсикологический Вестник.* 2014; 2:10-15.
11. Worek F., Thiermann H., Szinicz L., Eyer P. Kinetic analysis of interactions between human acetylcholinesterase, structurally different organophosphorus compounds and oximes // *Biochem. Pharmacol.* 2004; 68: 2237-2248.
12. Петров А.Н., Софронов Г.А., Нечипоренко С.П., Сомин И.Н. Антидоты фосфорорганических отравляющих веществ. *Рос. хим. ж.* 2004; 48(2): 110-116.
13. Савельева Е.И., Корягина Н.Л., Копейкин В.А., Сорокоумов П.Н., Конева В.Ю. Методика измерений массовых концентраций фосфорорганических веществ, реактивированных из состава аддуктов, в плазме крови методом газовой хромато-масс-спектрометрии. Свидетельство об аттестации № 222.0255/01.00258/О.А. от 22.10.14 г.
14. Каракашев Г.В., Криворотова Н.В., Морозова Т.Е., Корягина Н.Л., Савельева Е.И., Копейкин В.А. Методика измерений массовых концентраций О-алкилметилфосфонатов в моче методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-селективным детектированием. Свидетельство об аттестации № 222.0183/01.00258//2012 от 02.08.2012. ФР.1.39.2012.13710.
15. Уколов А.И., Орлова Т.И., Савельева Е.И., Радилов А.С. Хромато-масс-спектрометрическое определение свободных жирных кислот в плазме крови и моче с использованием экстрактивного алкилирования. *Журн. анал. химии.* 2015; 70(9): 968-975.
16. Орлова Т.И., Уколов А.И., Савельева Е.И., Радилов А.С. Определение свободных и этерифицированных жирных кислот в плазме крови методом газовой хроматографии с масс-селективным детектированием. *Аналитика и контроль.* 2015; 19(2): 183-188.
17. Корягина Н.Л., Савельева Е.И., Хлебникова Н.С., Уколов А.И., Уколова Е.С., Каракашев Г.В., Радилов А.С. Хромато-масс-спектрометрическое определение алкилметилфосфонатов в моче. «Масс-спектрометрия». 2015; 12(4): 236-246.
18. Munro N. B., Talmage S.S., Griffin L.C., Waters A.P., Watson A.P., King J.F., and Hauschild V. The synthesis, fate, and toxicity of chemical warfare agent degradation products // *Environ. Health Perspect.* 1999; 107(12): 933-974.
19. Riches J., Morton L., Read R.W., Black R.M. The trace analysis of alkyl alkylphosphonic acids in urine using gas chromatography-ion trap negative ion tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.* 2005; 816(1-2): 251-258.
20. Nagao M., Takatori T., Matsuda Y. et al. Definitive Evidence for the Acute Sarin Poisoning Diagnosis in the Tokyo Subway. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1997; 144(1):198-203.
21. Noort D., Hulst A.G., Platenburg D.H.J.M., Polhuijs M., Benschop H.P. Quantitative analysis of O-isopropyl methylphosphonic acid in serum samples of Japanese citizens allegedly exposed to sarin: estimation of internal dosage. *Arch. Toxicol.* 1998; 72(10): 671-675.
22. Minami M., Hui D-M, Katsumata M., Inagaki H., Boulet C.A. Method for the analysis of methylphosphonic acid metabolites of sarin and its ethanol-substituted analogue in urine as applied to the victims of the Tokyo sarin disaster // *J.Chromatogr. B.* 1997; 695(2): 237-244.
23. Polhuijs M., Langenberg J.P., Benschop H.P. New Method for Retrospective Detection of Exposure to Organophosphorus Anticholinesterases: Application to Alleged Sarin Victims of Japanese Terrorists. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1997; 146 (1): 156-161.
24. Holland K. E., Solano M. I., Johnson R. C. et al. Modifications to the Organophosphorus Nerve Agent-Protein Adduct Refluoridation Method for Retrospective Analysis of Nerve Agent Exposures. *J. Anal. Toxicol.* 2008; 32(1): 116-124.
25. Solano M. I., Thomas J. D., Taylor J. T. et al. Quantification of Nerve Agent VX-Butyrylcholinesterase Adduct Biomarker from an Accidental Exposure. *J. Anal. Toxicol.* 2008; 32(1): 68-73.
26. McGuire J.M., Taylor J. T., Byers C.E., Jakubowski E. M., Thomson S. A. Determination of VX-G Analogue in Red Blood Cells via Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Following an Accidental Exposure to VX. *J. Anal. Toxicol.* 2008; 32(1): 73-78.
27. Войтенко Н.Г., Прокофьева Д.С., Гончаров Н.В. Проблемы диагностики при интоксикации фосфорорганическими соединениями. *Токсикологический Вестник.* 2013; 5: 2-6.
28. WHO 1993. Biomarkers and Risk Assessment: Concepts and Principles. Geneva:World Health Organization.
29. Ashauer R, Hintermeister A, Caravatti I, Kretschmann A, Escher BI. Toxicokinetic and toxicodynamic modeling explains carry-over toxicity from exposure to diazinon by slow organism recovery. *Environ Sci Technol.* 2010; 44(10): 3963-3971.
30. Ashauer R, Escher BI. Advantages of toxicokinetic and toxicodynamic modelling in aquatic ecotoxicology and risk assessment. *J Environ Monit.* 2010; 12(11): 2056-2061.
31. Escher BI, Ashauer R, Dyer S, Hermens JL, Lee JH, Leslie HA, Mayer P, Meador JP, Warne MS. Crucial role of mechanisms and modes of toxic action for understanding tissue residue toxicity and internal effect concentrations of organic chemicals. *Integr Environ Assess Manag.* 2011; 7(1): 28-49.
32. Park YC, Lee S, Cho MH. The Simplest Flowchart Stating the Mechanisms for Organic Xenobiotics-induced Toxicity: Can it Possibly be Accepted as a "Central Dogma" for Toxic Mechanisms? *Toxicol Res.* 2014; 30(3): 179-84.
33. Kuznetsov S.V., Jenkins R.O., Goncharov N.V. Electrophysiological study of infant and adult rats under acute intoxication with fluoroacetamide. *J. Appl. Toxicol.* 2007; 27(6): 561-572.
34. Ермолаева Е.Е., Н.В. Гончаров, А.С. Радилов, Л.М. Глашкина, А.В. Кузнецов, И.В. Миндужев, П.В. Авдонин, И.А. Добрылюк, В.Р. Рембовский. Ингибирование эстераз и функциональная активность макрофагов, тромбоцитов, эндотелия при низкорезовом воздействии дизопропилфторфосфата и фосфакола. *Токсикологический вестник.* 2008; 2: 3-9.
35. Ермолаева Е.Е., Н.В. Гончаров, А.С. Радилов, А.В. Кузнецов, Л.М. Глашкина, И.В. Миндужев, С.В. Кузнецов, Г.А. Протасова, И.А. Добрылюк. Активность эстераз, состояние тромбоцитарного звена гомеостаза, нейро-мышечной проводимости и морфологические изменения при моделировании хронической пероральной интоксикации веществом, типа VX. *Токсикологический вестник.* 2008; 3: 3-10.
36. Шмурак В.И., Курдюков И.Д., Надеев А.Д., Войтенко Н.Г., Глашкина Л.М., Гончаров Н.В. Биохимические маркеры интоксикации фосфорорганическими отравляющими веществами // *Токсикологический Вестник.* 2012; 4: 30-34.
37. Гарнюк В.В., Войтенко Н.Г., Волкова М.О., Максаква А.М., Гончаров Н.В. Гемопоз у лабораторных животных при остром отравлении фосфорорганическими отравляющими веществами // *Токсикологический Вестник.* 2012; 4: 35-40.
38. Винокуров М.Г., Надеев А.Д., Войтенко Н.Г., Гончаров Н.В. Исследование клеточной иммунной системы при действии фторацетата. *Российский иммунологический журнал.* 2014; 8(3): 273-275.
39. Уколов А.И., Орлова Т.И., Войтенко Н.Г., Гончаров Н.В. Исследование энергетического метаболизма

крыс при действии фторацетата. Вестник Уральской медицинской академической науки. 2014; 3(49): 64-66.

40. Matsumoto I, Kuhara T. A new chemical diagnostic method for inborn errors of metabolism by mass spectrometry. MS Reviews, 1996;15:43-57.

41. Hao H, Li S, Zhou W, Wang H, Liu M, Shi C, Chen J, Xiao X. Metabolic products in urine of preterm infants characterized via gas chromatography-mass spectrometry. Int J Clin Exp Med. 2015; 8(9):16454-16462.

42. Sun W, Wang Y, Yang Y, Wang J, Cao Y, Luo F, Lu W, Peng Y, Yao H, Qiu P. The screening of inborn errors of metabolism in sick Chinese infants by tandem mass spectrometry and gas chromatography/mass spectrometry. Clin Chim Acta. 2011; 412(13-14):1270-4.

43. Гончаров Н.В., Уколов А.И., Орлова Т.И., Мигаловская Е.Д.,

Войтенко Н.Г. Метаболизма: на пути интеграции биохимии, аналитической химии, информатики // Успехи современной биологии. 2015.- Т.135.- №1.- с.3-17.

44. Goncharov N., E. Savelieva, V. Zinchenko, S. Kuznetsov, I. Mindukshev, M. Vinokurov, P. Avdonin, N. Voitenko, A. Ukolov, T. Orlova, R. Jenkins, A. Kuznetsov. Fluoroacetate. In: R.C. Gupta (Ed.) Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents, Academic Press/Elsevier, Amsterdam, second edition, 2015: 193-214. ISBN: 978-0-12-800159-2, 1198 pp.

45. Voicu VA, Thiermann H, Rădulescu FS, Miricioiu C, Miron DS. The toxicokinetics and toxicodynamics of organophosphonates versus the pharmacokinetics and pharmacodynamics of oxime antidotes: biological consequences. Basic Clin

Pharmacol Toxicol. 2010 Feb;106(2):73-85.

46. Sidell FR, Groff WA. The reactivability of cholinesterase inhibited by VX and sarin in man. Toxicol Appl Pharmacol. 1974; 27: 241-252.

47. Xie S, Borazjani A, Hatfield MJ, Edwards CC, Potter PM, Ross MK. Inactivation of lipid glyceryl ester metabolism in human THP1 monocytes/macrophages by activated organophosphorus insecticides: role of carboxylesterases 1 and 2. Chem Res Toxicol. 2010; 23(12):1890-1904.

48. Курдюков И.Д., Шмурак В.И., Надеев А.Д., Войтенко Н.Г., Прокофьева Д.С., Гончаров Н.В. «Эстеразный статус» организма при воздействии токсических веществ и фармпрепаратов. Токсикологический Вестник. 2012; 6: 6-13.

49. Maxwell DM. The specificity of carboxylesterase protection against

the toxicity of organophosphorus compounds. Toxicol Appl Pharmacol. 1992;114(2):306-312.

50. Белинская Д.А., Шмурак В.И., Прокофьева Д.С., Гончаров Н.В. Исследование связывания зомана с альбумином методами молекулярного моделирования // Токсикологический Вестник. 2012. 6: 13-19.

51. Белинская Д.А., В.И. Шмурак, Д.С. Прокофьева, Н.В. Гончаров. Сывороточный альбумин: поиск новых сайтов взаимодействия с фосфорорганическими соединениями на примере зомана // Биоорганическая химия. 2014; 40 (5):541-549.

52. Гончаров Н.В., Д.А. Белинская, А.В. Разыграев, А.И. Уколов. О ферментативной активности альбумина. Биоорганическая химия. 2015; 41(2): 131-144.

REFERENCES:

1. Worek F., Thiermann H., Szinicz L., Eyer P. Kinetic analysis of interactions between human acetylcholinesterase, structurally different organophosphorus compounds and oximes. Biochem. Pharmacol. 2004; 68: 2237-2248.

2. Prokofieva D.S., Voitenko N.G., Gustyleva L.K., Babakov V.N., Savelieva E.I., Jenkins R.O., Goncharov N.V. Microplate spectroscopic methods for determination of the organophosphate soman. J. Environ. Monit. 2010; 12(6): 1349-1354.

3. Prokofieva D.S., Jenkins R.O., Goncharov N.V. Microplate biochemical determination of Russian VX: Influence of admixtures and avoidance of false negative results. Anal Biochem. 2012; 424(2): 108-113.

4. Krasnov I.A., Podolskaia E.P., Goncharov N.V., Babakov V.N., Glashkina L.M., Ermolaeva E.E., Dubrovskii Ya.A., Prokofieva D.S., Voitenko N.G., Smolihina T.I., Polyakov N.B., Radilov A.S., Krasnov N.V. [Changes of spectra of fibrinopeptide derivatives in plasma by the action of the O-isobutyl-S-(2-diethylaminoethyl)-methylthiophosphonate]. Nauchnoe priborostrenie. 2008; 18(4): 29-36 (in Russian).

5. Babakov V.N., Podolskaya E.P., Goncharov N.V., Glashkina L.M., Krasnov I.A., Polyakov N.B., Voitenko N.G., Prokofieva D.S., Krasnov N.V., Radilov A.S. [New markers of intoxication by organophosphorus compounds in the peptide fraction of rat plasma]. Toksikologicheskii vestnik. 2010; 2: 31-38 (in Russian).

6. Koriagina N.L., Savelieva E.I., Khlebnikova N.S., Kopeikin V.A., Koneva V.Yu., Radilov A.S. [Features of the analysis of organophosphorus agents, reactivated from the adducts with blood proteins in determining of chemical weapons]. Toksikologicheskii vestnik. 2014; 4: 39-46 (in Russian).

7. Black R. M. Historical and perspectives of bioanalytical methods for chemical warfare // J. of chromatography B. 2010; 878: 1207-1215.

8. Ukolov A.I., Orlova T.I., Savel'eva E.I., Radilov A.S., Goncharov N.V. [Administration of sublethal amounts of organophosphorus agents using antidote therapy changing fatty acid profiles of rat plasma]. Toksikologicheskii vestnik. 2015; 132(3): 2-11 (in Russian).

9. Worek F., Thiermann H., Szinicz L.,

Eyer P. Kinetic analysis of interactions between human acetylcholinesterase, structurally different organophosphorus compounds and oximes. Biochem. Pharmacol. 2004; 68: 2237-2248.

10. Yudin M.A., Bykov V.N., Nikiforov A.S., Sarana M.A. [Specific manifestations of non-cholinolytic action of central muscarinic receptors blockers]. Toksikologicheskii vestnik. 2014; 2: 10-15 (in Russian).

11. Worek F., Thiermann H., Szinicz L., Eyer P. Kinetic analysis of interactions between human acetylcholinesterase, structurally different organophosphorus compounds and oximes. Biochem. Pharmacol. 2004; 68: 2237-2248.

12. Petrov A.N., Sofronov G.A., Nechiporenko S.P., Somin I.N. Antidotes of organophosphorus warfare agents. Rossiyskiy khimicheskii zhurnal. 2004; 48 (2): 110-116 (in Russian).

13. Savel'eva E.I., Koryagina N.L., Kopeykin V.A., Sorokoumov P.N., Koneva V.Yu. Procedure for the Determination of Mass Concentrations of Organophosphorus Compounds, Reactivated from the Adducts in Blood Plasma by GC-MS. Certificate of Attestation N 222.0255/01.00258/2014 October 22, 2014 r. (in Russian).

14. Karakashev G.V., Krivorotova N.V., Morozova T.E., Koryagina N.L., Savel'eva E.I., Kopeykin V.A. Procedure for the Determination of Mass Concentrations of O-Alkyl Methyl Phosphonates in Urine by High-Performance Liquid Chromatography with Tandem Mass - Selective Detection. Certificate of Attestation N 222.0183/01.00258//2012, August 02.08.2012, FR.1.39.2012.13710 (in Russian).

15. Ukolov A.I., Orlova T.I., Savelieva E.I., Radilov A.S. Chromatographic-Mass Spectrometric Determination of Free Fatty Acids in Blood Plasma and Urine Using Extractive Alkylation. Journal of Analytical Chemistry. 2015; 70(9): 1124-1131.

16. Orlova T.I., Ukolov A.I., Savelieva E.I., Radilov A.S. GC-MS quantification of free and esterified fatty acids in blood plasma. Analitika i kontrol. 2015; 19(2): 183-188 (in Russian).

17. Koryagina N.L., Savel'eva E.I., Khlebnikova N.S., Ukolov A.I., Ukolova E.S., Karakashev G.V., Radilov A.S.

[Chromatography/mass spectrometry determination of alkyl methylphosphonic acids in urine]. Mass-spektrometriya. 2015; 12(4): 236-246 (in Russian).

18. Munro N. B., Talmage S.S., Griffin L.C., Waters A.P., Watson A.P., King J.F., and Hauschild V. The sources, fate, and toxicity of chemical warfare agent degradation products. Environ. Health Perspect. 1999; 107(12): 933-974.

19. Riches J., Morton I., Read R.W., Black R.M. The trace analysis of alkyl alkylphosphonic acids in urine using gas chromatography-ion trap negative ion tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. B. 2005; 816(1-2): 251-258.

20. Nagao M., Takatori T., Matsuda Y. et al. Definitive Evidence for the Acute Sarin Poisoning Diagnosis in the Tokyo Subway. Toxicol. Appl. Pharmacol. 1997; 144(1):198-203.

21. Noort D., Hulst A.G., Platenburg D.H.J.M., Polhuijs M., Benschop H.P. Quantitative analysis of O-isopropyl methylphosphonic acid in serum samples of Japanese citizens allegedly exposed to sarin: estimation of internal dosage. Arch. Toxicol. 1998; 72(10): 671-675.

22. Minami M., Hui D-M, Katsumata M., Inagaki H., Boulet C.A. Method for the analysis of methylphosphonic acid metabolites of sarin and its ethanol-substituted analogue in urine as applied to the victims of the Tokyo sarin disaster. J.Chromatogr. B. 1997; 695(2): 237-244.

23. Polhuijs M., Langenberg J.P., Benschop H.P. New Method for Retrospective Detection of Exposure to Organophosphorus Anticholinesterases: Application to Alleged Sarin Victims of Japanese Terrorists. Toxicol Appl Pharmacol. 1997; 146 (1): 156-161.

24. Holland K. E., Solano M. I., Johnson R. C. et al. Modifications to the Organophosphorus Nerve Agent-Protein Adduct Refluoridation Method for Retrospective Analysis of Nerve Agent Exposures. J. Anal. Toxicol. 2008; 32(1): 116-124.

25. Solano M. I., Thomas J. D., Taylor J. T. et al. , Quantification of Nerve Agent VX-Butyrylcholinesterase Adduct Biomarker from an Accidental Exposure. J. Anal. Toxicol. 2008; 32(1): 68-73.

26. McGuire J.M., Taylor J. T., Byers C.E., Jakubowski E. M., Thomson S. A. Determination of VX-G Analogue in Red Blood Cells via Gas Chromatography-

Tandem Mass Spectrometry Following an Accidental Exposure to VX. J. Anal. Toxicol. 2008; 32(1): 73-78.

27. Voitenko N.G., Prokofieva D.S., Goncharov N.V. [Problems with diagnosis of intoxication by organophosphorus compounds]. Toksikologicheskii vestnik. 2013; 5: 2-6 (in Russian).

28. WHO 1993. Biomarkers and Risk Assessment: Concepts and Principles. Geneva:World Health Organization.

29. Ashauer R, Hintermeister A, Caravatti I, Kretschmann A, Escher BI. Toxicokinetic and toxicodynamic modeling explains carry-over toxicity from exposure to diazinon by slow organism recovery. Environ Sci Technol. 2010; 44(10): 3963-3971.

30. Ashauer R, Escher BI. Advantages of toxicokinetic and toxicodynamic modelling in aquatic ecotoxicology and risk assessment. J Environ Monit. 2010; 12(11): 2056-2061.

31. Escher BI, Ashauer R, Dyer S, Hermens JL, Lee JH, Leslie HA, Mayer P, Meador JP, Warne MS. Crucial role of mechanisms and modes of toxic action for understanding tissue residue toxicity and internal effect concentrations of organic chemicals. Integ Environ Assess Manag. 2011; 7(1): 28-49.

32. Park YC, Lee S, Cho MH. The Simplest Flowchart Stating the Mechanisms for Organic Xenobiotics-induced Toxicity: Can it Possibly be Accepted as a "Central Dogma" for Toxic Mechanisms? Toxicol Res. 2014; 30(3): 179-84.

33. Kuznetsov S.V., Jenkins R.O., Goncharov N.V. Electrophysiological study of infant and adult rats under acute intoxication with fluoroacetamide. J. Appl. Toxicol. 2007; 27(6): 561-572.

34. Ermolaeva E.E., Goncharov N.V., Radilov A.S., Glashkina L.M., Kuznetsov A.V., Mindukshev I.V., Avdonin P.V., Dobrylko I.A., Rembovskii V.R. [Inhibition of esterases and functional activity of macrophages, platelets, endothelium at low-level exposure to diisopropyl fluoroophosphate and phosphacol]. Toksikologicheskii vestnik. 2008; 2: 3-9 (in Russian).

35. Ermolaeva E.E., Goncharov N.V., Radilov A.S., A.B. Kuznetsov A.V., Glashkina L.M., Mindukshev I.V., Kuznetsov S.V., Protasova G.A., Dobrylko I.A. [Активность эстераз, состояние тромбоцитарного звена гемостаза, нейро-мышечной проводимости и мор-

- фологические изменения при моделировании хронической пероральной интоксикации веществом, типа VX]. *Toksikologicheskii vestnik*. 2008; 3: 3-10 (in Russian).
- 36.** *Shmurak V.I., Kurdiukov I.A., Nadeev A.D., Voitenko N.G., Glashkina L.M., Goncharov N.V.* [Biochemical markers of intoxication by organophosphorus chemical agents]. *Toksikologicheskii vestnik*. 2012; 4: 30-34 (in Russian).
- 37.** *Garmyuk V.V., Voitenko N.G., Volkova M.O., Maksakova A.O., Goncharov N.V.* [Hematopoiesis in laboratory animals with acute poisoning with organophosphorus agents]. *Toksikologicheskii vestnik*. 2012; 4: 35-40 (in Russian).
- 38.** *Vinokurov M.G., Nadeev A.D., Voitenko N.G., Goncharov N.V.* [Investigation of immune system cells exposed by fluoroacetate]. *Rossiiskii immunologicheskii zhurnal*. 2014; 8 (3): 273-275 (in Russian).
- 39.** *Ukolov A.I., Orlova T.I., Voitenko N.G., Goncharov N.V.* [The study of energy metabolism in rats under the influence of fluoroacetate]. *Vestnik Uralskoi meditsinskoi akademicheskoi nauki*. 2014; 3(49): 64-66 (in Russian).
- 40.** *Matsumoto I., Kuhara T.* A new chemical diagnostic method for inborn errors of metabolism by mass spectrometry. *MS Reviews*, 1996; 15:43-57.
- 41.** *Hao H., Li S., Zhou W., Wang H., Liu M., Shi C., Chen J., Xiao X.* Metabolic products in urine of preterm infants characterized via gas chromatography-mass spectrometry. *Int J Clin Exp Med*. 2015; 8(9):16454-16462.
- 42.** *Sun W, Wang Y, Yang Y, Wang J, Cao Y, Luo F, Lu W, Peng Y, Yao H, Qiu P.* The screening of inborn errors of metabolism in sick Chinese infants by tandem mass spectrometry and gas chromatography/mass spectrometry. *Clin Chim Acta*. 2011; 412(13-14):1270-4.
- 43.** *Goncharov N.V., Ukolov A.I., Orlova T.I., Migalovskaia E.D., Voitenko N.G.* Metabolomics: On the Way to an Integration of Biochemistry, Analytical Chemistry, and Informatics. *Biology Bulletin Reviews*, 2015; 5 (4): 296-307. DOI: 10.1134/S2079086415040027.
- 44.** *Goncharov N., E. Savelieva, V. Zinchenko, S. Kuznetsov, I. Mindukshev, M. Vinokurov, P. Avdonin, N. Voitenko, A. Ukolov, T. Orlova, R. Jenkins, A. Kuznetsov.* Fluoroacetate. In: R.C. Gupta (Ed.) *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents*, Academic Press/Elsevier, Amsterdam, second edition, 2015: 193-214. ISBN: 978-0-12-800159-2, 1198 pp.
- 45.** *Voicu VA, Thiermann H, Rădulescu FS, Mircioiu C, Miron DS.* The toxicokinetics and toxicodynamics of organophosphonates versus the pharmacokinetics and pharmacodynamics of oxime antidotes: biological consequences. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2010 Feb;106(2):73-85.
- 46.** *Sidell FR, Groff WA.* The reactivability of cholinesterase inhibited by VX and sarin in man. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1974; 27: 241-252.
- 47.** *Xie S, Borazjani A, Hatfield MJ, Edwards CC, Potter PM, Ross MK.* Inactivation of lipid glyceryl ester metabolism in human THP1 monocytes/macrophages by activated organophosphorus insecticides: role of carboxylesterases 1 and 2. *Chem Res Toxicol*. 2010; 23(12):1890-1904.
- 48.** *Kurdiukov I.D., Shmurak V.I., Nadeev A.D., Voitenko N.G., Prokofieva D.S., Goncharov N.V.* ["Esterase status" of the body when exposed to toxic substances and pharmaceuticals]. *Toksikologicheskii vestnik*. 2012; 6: 6-13 (in Russian).
- 49.** *Maxwell DM.* The specificity of carboxylesterase protection against the toxicity of organophosphorus compounds. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1992;114(2):306-312.
- 50.** *Belinskaia D.A., Shmurak V.I., Prokofieva D.S., Goncharov N.V.* [Research of soman binding to albumin with molecular modeling]. *Toksikologicheskii vestnik*. 2012. 6: 13-19 (in Russian).
- 51.** *Belinskaia D.A., Shmurak V.I., Prokofieva D.S., Goncharov N.V.* Serum Albumin: Search for New Sites of Interaction with Organophosphorus Compounds by the Example of Soman. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 2014; 40 (5): 499-519. DOI: 10.1134/S1068162014050033 (in Russian).
- 52.** *Goncharov N.V., Belinskaia D.A., Razygraev A.V., Ukolov A.I.* On the enzymatic activity of albumin. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 2015; 41(2): 113-124. DOI: 10.1134/S1068162015020041. (in Russian).

N.L. Koryagina, E.I. Savelieva, A.I. Ukolov, D.S. Prokofieva, N.S. Khlebnikova, T.I. Orlova, E.S. Ukolova, A.S. Radilov, N.V. Goncharov

POSSIBILITIES OF CHEMICAL TOXICOLOGICAL ANALYSIS IN MODELING ACUTE POISONING WITH VR AND ANTIDOTAL THERAPY USING CARBOXIM

Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology, Federal Medical Biological Agency, 188663, settlement Kuz'molovskiy, Vsevolozhsk District, Leningrad Region, Russian Federation

The effect of the cholinesterase reactivator carboxim was studied on the possibility of the determination of markers of VR (O-isobutyl S-(2-diethylaminoethyl) methylthiophosphonate) in biomedical samples obtained in in vivo acute experiments in rats injected with $2 \times 0.4LD_{50}$ of VR at 1 hour interval. It was found that acetylcholinesterase (AChE) is a more sensitive blood plasma biomarker compared to butyrylcholinesterase (BChE) in blood plasma. Carboxim therapy led to AChE reactivation 3 h after poisoning, whereas in the absence of therapy, the AChE activity recovered within 3 days. Fluoride-based regeneration of organophosphorus nerve agents (OPNAs) from blood plasma protein adducts was possible within 7 days after poisoning irrespective of whether the therapy was applied or not. The effect of the reactivator on the excretion of VR hydrolysis products was considerable. A day after poisoning and carboxim injection, O-isobutyl methylphosphonate (iBuMPA) was detected in urine at a level of 17 ng/ml against 7.4 ng/ml in the urine samples of untreated animals; after 3 days, iBuMPA could be detected at a level of 1 ng/ml exclusively in the latter urine samples. It was also found that the levels of free and esterified fatty acids in the blood plasma samples of animals not subjected to antidotal therapy reached a maximum on the 7th day after acute exposure to VR. Therefore, the blood plasma levels of free and esterified fatty acids can be used as an additional toxicodynamic parameter of VR poisoning.

Keywords: *Chemical toxicological analysis, organophosphorus nerve agents, VR, markers, gas chromatography: mass spectrometry, antidotal therapy.*

Материал поступил в редакцию 06.04.2016 г.