

УДК 577.152.311 : 615.099.08 : 615.355

Холинэстеразы как средства профилактики отравлений фосфорорганическими ингибиторами

К. А. Аникиенко, В. С. Добрянский, Т. И. Новожилова, И. И. Кашникова, Е. А. Бычихин

КОНСТАНТИН АЛЕКСАНДРОВИЧ АНИКИЕНКО — доктор химических наук, профессор, руководитель лаборатории ГУП «Государственный научно-исследовательский институт органической химии и технологии» (ГУП ГосНИИОХТ). Область научных интересов: физико-химические методы исследования в биоорганической химии, химия физиологически активных веществ.

ВЯЧЕСЛАВ СТАНИСЛАВОВИЧ ДОБРЯНСКИЙ — доктор медицинских наук, профессор, руководитель лаборатории ГУП ГосНИИОХТ. Область научных интересов: фармакология, токсикология.

ТАТЬЯНА ИВАНОВНА НОВОЖИЛОВА — кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник ГУП ГосНИИОХТ. Область научных интересов: токсины растительного, животного и микробного происхождения, механизмы их действия.

ИРИНА ИВАНОВНА КАШНИКОВА — кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник ГУП ГосНИИОХТ. Область научных интересов: фармакология и токсикология.

ЕВГЕНИЙ АЛЕКСАНДРОВИЧ БЫЧИХИН — кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник ГУП ГосНИИОХТ. Область научных интересов: физико-химические методы исследования веществ, энзимология.

111024 Москва, шоссе Энтузиастов, д. 23, ГУП ГосНИИОХТ, тел. (095)273-87-19, (095)273-87-39, факс (095)273-87-19, E-mail gosnii@online.ru

Введение

Проблема антидотной терапии отравлений фосфорорганическими ингибиторами холинэстераз (ФОИ) весьма актуальна ввиду широкого применения этих соединений на производстве, в сельском хозяйстве, быту, а также из-за существующей потенциальной угрозы использования ФОИ в качестве средств массового поражения в военных целях, террористических актах и из-за возможности возникновения чрезвычайных ситуаций (аварии при хранении, транспортировке и т.п.).

За последнее десятилетие накоплен огромный экспериментальный и клинический материал по изучению лечебно-профилактических средств и рецептур на их основе, которые могут быть применены при отравлении ФОИ [1—4]. В настоящее время в качестве средств антидотной профилактики интоксикаций ФОИ преимущественно используются карбаматы, а как лечебные средства — холинолитики и реактиваторы холинэстераз в сочетании с противосудорожными препаратами (типа диазепамы) [5—11].

Лечение отравлений ФОИ требует проведения многокомпонентной комбинированной терапии, включающей одновременное или параллельное использование нескольких препаратов или их смесей. Недостаточная эффективность существующих средств, а также побочное токсическое действие медицинских препаратов, в том числе снижение дееспособности человека,

вызывают необходимость поиска новых средств профилактики и терапии отравлений фосфорорганическими ингибиторами холинэстераз [1—4, 11—14].

К значительным достижениям последнего десятилетия следует отнести применение различных холинэстераз в качестве профилактических средств, нейтрализующих токсическое действие ФОИ. В опытах на мышах и нечеловекообразных обезьянах убедительно показано, что нейтрализация ФОИ в системе кровообращения предварительно введенными экзогенными холинэстеразами имеет явное преимущество перед терапией с использованием традиционных антидотов, поскольку обеспечивает надежную защиту от действия нескольких летальных доз таких высокотоксичных ФОИ, как V_x и зоман, при полном отсутствии каких-либо симптомов, нарушающих дееспособность экспериментальных животных [15—20].

Целью настоящей работы являлось исследование возможности применения препаратов высокоочищенной ацетилхолинэстеразы (АХЭ) из яда среднеазиатской кобры и бутирилхолинэстеразы (БуХЭ) сыворотки крови лошади в качестве средств профилактики отравления ФОИ. Представлялось также целесообразным оценить антидотную активность яда кобры и отдельных его компонентов — токсинов Т-1, Т-3, Т-4, а также яда крайта — α -бунгаротоксина. α -Нейротоксины из ядов змей обратимо блокируют постсинаптические никотиновые рецепторы [21], поэтому в условиях интоксикации ФОИ

никотиновые эффекты ингибиторов могут быть предупреждены.

Выделение и очистка холинэстераз для получения лечебных препаратов ферментов

Фармакологические свойства холинэстераз изучали на очищенных препаратах ферментов с высокой удельной активностью. Методики очистки АХЭ яда кобры и БуХЭ сыворотки крови лошади с помощью аффинной хроматографии описаны в [22, 23]. Нами разработан эффективный способ очистки этих холин-эстераз с использованием нового аффинного сорбента.

Схема выделения АХЭ из цельного яда кобры включает проведение гель-фильтрации исходного материала на Сефадексе G-100sf с последующей очисткой фермента методом ионообменной хроматографии на карбоксиметилцеллюлозе или аффинной хроматографии на специально синтезированном сорбенте. На первой стадии очистки использовалась колонка (5×100 см) с Сефадексом G-100sf, на которую наносили до 2,0 г цельного яда. Фракции, содержащие АХЭ, объединяли и подвергали дальнейшей очистке на карбоксиметилцеллюлозе в 0,01 М фосфатном буферном растворе (рН = 6,2) с градиентом концентрации хлорида натрия (от 0,05 до 0,1 М).

С помощью данного метода выделены две изоформы АХЭ с различной активностью: АХЭ-I и АХЭ-II. Первая характеризуется значением изоэлектрической точки pI , равным 6,85, для второй — $pI = 7,90$. Удельная активность АХЭ-I составляет 200, а АХЭ-II — 1000 мкмоль/(мин·мг). Выделенные изоформы АХЭ проявляют различную устойчивость в 0,05 М фосфатном буферном растворе (рН = 6,5) при температуре 6 °С. При хранении АХЭ-I практически полностью теряет активность уже через 24 ч, активность АХЭ-II снижается только на 20%. В более щелочных буферных растворах (рН = 6,8—7,3) активность АХЭ-II сохраняется почти без изменений в течение нескольких недель.

Как альтернативу описанному методу очистки АХЭ применяли метод аффинной хроматографии. Для этого был синтезирован аффинный сорбент на основе СН-Сефарозы 4В, к которой с помощью водорастворимого карбодиимида был присоединен спермин. Полученное производное подвергали ацилированию янтарным ангидридом с последующим присоединением специфического лиганда — хлорида 2-аминоэтил-

триметиламмония.

Новый аффинный сорбент имеет структуру:



Очистку препарата АХЭ, полученного после гель-фильтрации на Сефадексе G-100sf, проводили на колонке с синтезированным аффинным сорбентом в среде 0,01 М фосфатного буферного раствора, содержащего 0,1 М раствор NaCl (рН = 7,4). Фермент элюировали 0,05 М раствором иодида тетраэтиламмония в том же буферном растворе. Регенерацию сорбента осуществляли последовательным промыванием 2 М раствором хлорида натрия и исходным буферным раствором.

Таким методом из яда среднеазиатской кобры удалось выделить АХЭ с удельной активностью по ацетилхолину ~3000 мкмоль/(мин·мг).

Для очистки бутилхолинэстеразы сыворотки крови лошади использовали метод аффинной хроматографии. Исходным препаратом служил фермент производства НИИВС (г. Пермь) с удельной активностью 18—27 мкмоль/(мин·мг). Предварительно была проведена оценка нескольких обратимых ингибиторов холинэстераз в качестве элюирующих агентов. Результаты представлены в табл. 1. Как следует из полученных данных, наиболее эффективным элюирующим агентом при очистке БуХЭ является декаметоний бромид.

В дальнейших исследованиях в качестве исходного препарата БуХЭ для аффинной хроматографии мы использовали предварительно очищенный продажный фермент (очистка на колонке с Сефадексом G-100sf в 0,01 М фосфатном буферном растворе, содержащем 0,1 М раствор NaCl). Удельная активность очищенной БуХЭ составляет 40—50 мкмоль/(мин·мг). Таким образом, путем сочетания методов гель-фильтрации и аффинной хроматографии удается получить образцы БуХЭ сыворотки крови лошади с удельной активностью 800—1000 мкмоль/(мин·мг).

Оценка специфической фармакологической активности препаратов АХЭ и БуХЭ на модели острого отравления ингибиторами холинэстераз

Материалы и методы. Для проведения токсикологических и фармакологических исследований были использованы следующие препараты: яд среднеазиатской

Таблица 1

Результаты очистки бутилхолинэстеразы сыворотки крови лошади методом аффинной хроматографии

Элюирующий агент		Активность препарата ¹ , мкмоль/(мин·мг)	
вещество	концентрация, мМ	исходный	очищенный
Тетраэтиламмония хлорид	50	18	40
Декаметония бромид	0,05	18	40
	1,0	18	150
	3,0	18	440
	0,1	27	270
1,3-Бис-[ω-(диэтил-о-нитробензиламмоний)пентил]аллоказин дибромид	0,3	27	150

¹ Субстрат — бутирилхолин 10 мМ; рН = 8,0; 25 °С

Антидотная активность цельного яда кобры и атропина по отношению к ГД-42 и ДФФ (опыты на мышах)

Премедикация		ГД-42		ДФФ	
вещество	доза, мг/кг	ЛД ₅₀ , мг/кг (в/м)	З.И.	ЛД ₅₀ , мг/кг (в/м)	З.И.
Контроль	—	0,022 (0,021—0,024)	—	3,56 (3,10—3,85)	—
Яд кобры	0,5 (в/б)	0,02 (0,017—0,023)	0,91	3,50 (3,20—3,90)	0,98
Яд кобры + атропин	0,5 (в/б) 20,0 (в/м)	0,048 (0,045—0,053)	2,18	9,27 (7,22—11,91)	2,60
Атропин	20,0 (в/м)	0,033 (0,03—0,034)	1,41	7,0 (6,55—7,48)	1,96

кобры, выделенный методами гель- и ионообменной хроматографии [24], токсины из него Т-1, Т-3, Т-4, цитраконилированный токсин кобры (ЦКТ-1), представляющий собой токсин Т-1, модифицированный по ϵ -NH₂-группам лизина цитраконовым ангидридом, что позволило сохранить нативную структуру белка и значительно снизить его токсичность, препараты АХЭ из яда среднеазиатской кобры с удельной активностью 800—3000 мкмоль/(мин•мг), препараты БухЭ сыворотки крови лошади с удельной активностью 400—1100 мкмоль/(мин•мг), α -бунгаротоксин (фирма «Sigma», США).

В качестве модельных ингибиторов холинэстеразы применяли диизопропилфторфосфат (ДФФ) и метилсульфометилат О-этил-S-(2-этилмеркаптоэтил)метилтиофосфоната (ГД-42). Оба соединения были синтезированы в ГосНИИОХТ по методам, представленным в работах [25, 26].

В экспериментах использовали также традиционные лекарственные препараты: сульфат атропина (Химфармзавод, г. Воронеж) и недеполяризующие миорелаксанты пипекурония бромид («Gedeon Richter», Венгрия) и панкурония бромид («Lasapharma S.P.A.», Италия), а также деполяризующий миорелаксант суксаметония бромид («Unique Pharmaceutical Labs», Индия).

Токсикологические и фармакологические исследования проводили на здоровых половозрелых белых нелинейных мышах-самцах (масса 24—30 г), содержащихся в виварии на стандартном рационе; число животных — 3000. Препараты яда кобры и токсинов в физиологическом растворе вводили внутрибрюшинно (в/б); растворы АХЭ яда кобры и БухЭ сыворотки крови лошади в 0,01 М фосфатном буферном растворе, содержащем 0,15 М раствор NaCl (рН=7,3) — внутривенно (в/в) или внутрибрюшинно; водные растворы ГД-42 и ДФФ — внутримышечно (в/м) и внутривенно; фармакологические анализаторы — внутримышечно.

Эффективность препаратов оценивали по величине защитного индекса (З.И.):

$$\text{З.И.} = \text{ЛД}_{50}(\text{премедикация})/\text{ЛД}_{50}(\text{контроль})$$

Значения ЛД₅₀ определяли, используя в опыте с каждой дозой 6—10 животных. Статистическую обработку проводили по методу Литчфилда и Уилкоксона.

Количество фермента, вводимого животным в опытах *in vivo*, измеряли в единицах активности (ед.). Одна единица соответствует количеству фермента, катализирующему гидролиз 1 мкмоль субстрата/мин при рН = 8,0 и 25 °С. Активность ферментов определяли методом потенциометрического титрования в режиме рН-

статирования (рН = 8,0 и 25 °С) по скорости выделения уксусной и масляной кислот в реакционной смеси с помощью автотитратора модели RTS-822 (фирма «Radiometer», Дания). При определении активности концентрация субстрата ацетилхолина для АХЭ составляла 2,3 мМ, а бутирилхолина для БухЭ — 10 мМ.

Антидотная активность цельного яда кобры. Предварительные токсикологические исследования показали, что токсичность яда кобры для лабораторных мышей характеризуется значением ЛД₅₀ = 1,27 (0,79—2,04) мг/кг.

При оценке защитной эффективности яда кобры использовали в дозе 0,5 мг/кг. Эта доза не вызывает какой-либо клинической симптоматики и хорошо переносится всеми животными (наблюдение в течение 5 сут.). Растворы яда вводили мышам за 40 мин до введения ФОИ. Исследовали как индивидуальное влияние яда на уровень токсичности ингибитора АХЭ, так и при его сочетании с М-холинолитиком атропином, который вводили за 30 мин до ФОИ.

Как следует из данных табл. 2, яд кобры не оказывает влияния на токсичность ингибиторов АХЭ, но заметно усиливает антидотную эффективность атропина.

Антидотная активность нейротоксинов. Проведены сравнительные токсикологические и фармакологические исследования возможности использования препаратов гомогенных токсинов из яда среднеазиатской кобры (Т-1, Т-3, Т-4) и α -бунгаротоксина (α -БТ) в качестве средств профилактики отравлений ингибиторами АХЭ.

Установленные среднесмертельные дозы (ЛД₅₀) для Т-1, Т-3, Т-4, α -БТ составляют (в мг/кг) 0,87 (0,67—1,1), 9,46 (7,64—11,73), 10,64 (5,76—19,66), 0,56 (0,44—0,77) соответственно.

Эффективность профилактического действия токсинов оценивали при введении их в хорошо переносимых дозах (~1/2 ЛД₅₀) за 60 мин до воздействия ингибитора холинэстеразы ГД-42 (ЛД₁₀₀). При этом исследовали действие как самих токсинов, так и их сочетания с атропином, который вводили за 5 мин до ГД-42.

Установлено, что при отравлении ингибитором ГД-42 ни один из исследованных токсинов сам по себе не оказывает защитного действия. Отмечается, что только Т-1 усиливает защитное действие атропина практически в такой же степени, как α -бунгаротоксин (табл. 3). В связи с этим была проведена сравнительная оценка защитной эффективности Т-1 и смеси Т-1 с атропином при отравлениях ГД-42 и ДФФ (табл. 4).

Таблица 3

Антидотная активность нейротоксинов кобры, α -бунгаротоксина и атропина по отношению к ГД-42 (доза 0,03 мг/кг, (в/м), опыты на мышах)

Премедикация		Токсическое действие ГД-42	
вещество	доза, мг/кг	<i>m/n</i> [*]	выжило в группе, %
Контроль	—	10/10	0
T-1	0,5 (в/б)	10/10	0
T-3	5,0 (в/б)	6/6	0
T-4	5,0 (в/б)	6/6	0
T-1 + T-4	0,5 (в/б) 5,0 (в/б)	6/6	0
α -Бунгаротоксин	0,25 (в/б)	10/10	0
Атропин	10,0 (в/м)	6/10	40
T-1 + атропин	0,5 (в/б) 10,0 (в/м)	4/10	60
T-3 + атропин	5,0 (в/б) 10,0 (в/м)	6/6	0
T-4 + атропин	5,0 (в/б) 10,0 (в/м)	8/8	0
T-1 + T-4 + атропин	0,5 (в/б) 5,0 (в/б) 10,0 (в/м)	8/10	20
α -Бунгаротоксин + атропин	0,25 (в/б) 10,0 (в/м)	5/12	58

* *m* — количество павших животных в группе, *n* — общее количество животных в группе.

Таблица 4

Антидотная активность нейротоксина кобры T-1 и атропина по отношению к ГД-42 и ДФФ (опыты на мышах)

Премедикация		ГД-42		ДФФ	
вещество	доза, мг/кг	ЛД ₅₀ , мг/кг (в/м)	З.И.	ЛД ₅₀ , мг/кг (в/м)	З.И.
Контроль	—	0,022 (0,021—0,024)	—	3,56 (3,29—3,85)	—
T-1	0,5 (в/б)	0,024 (0,019—0,028)	1,09	5,20 (4,34—6,22)	1,46
T-1 + атропин	10,5 (в/м) 20,0 (в/м)	0,034 (0,028—0,043)	1,54	11,4 (10,0—13,1)	3,20
Атропин	20,0 (в/м)	0,038 (0,028—0,037)	1,48	7,0 (6,55—7,48)	1,96

Анализ результатов этой серии опытов показал, что нейротоксин T-1 сам оказывает защитное действие от ФОИ, более выраженное при интоксикации ДФФ, и существенно увеличивает защитную эффективность атропина.

Антидотная активность цитраконилированного токсина. Фармакологические и токсикологические исследования цитраконилированного токсина из яда кобры (ЦКТ-1) показали, что при модифицировании цитраконовым ангидридом T-1 утрачивает токсичность (ЛД₅₀ ЦКТ-1 существенно превышает 100 мг/кг).

В предварительных экспериментах было установлено, что наибольшая защита от фосфорорганических ингибиторов холинэстераз имеет место при введении дозы ЦКТ-1, равной 25 мг/кг, за 30 мин до введения ингибитора.

Сравнительная оценка защитной эффективности ЦКТ-1 и его сочетания с атропином при отравлениях ГД-42 и ДФФ (табл. 5) показала, что защитная эффективность ЦКТ-1 в отношении токсического действия ДФФ, так же как T-1, больше, чем в отношении токсического действия ГД-42. ЦКТ-1 усиливает антидотное действие

Таблица 5

Антидотная активность цитраконилированного токсина кобры и атропина по отношению к ГД-42 и ДФФ (опыты на мышах)

Премедикация		ГД-42		ДФФ	
вещество	доза, мг/кг	ЛД ₅₀ , мг/кг (в/м)	З.И.	ЛД ₅₀ , мг/кг (в/м)	З.И.
Контроль	—	0,022 (0,021—0,024)	—	3,56 (3,29—3,85)	—
ЦКТ-1	25,0 (в/б)	0,02 (0,018—0,038)	0,91	4,39 (3,40—5,67)	1,23
Атропин	20,0 (в/м)	0,031 (0,028—0,037)	1,43	7,0 (6,55—7,48)	1,96
ЦКТ-1 + атропин	25,0 (в/б) + 20,0 (в/м)	0,034 (0,026—0,042)	1,55	9,26 (7,93—10,82)	2,60

атропина в условиях интоксикаций обоими ФОИ, но в меньшей степени, чем это наблюдается у немодифицированного токсина.

Антидотная активность АХЭ яда кобры. Как показали фармакологические и токсикологические исследования препаратов АХЭ, в дозах 100 и 200 ед./мышь они усиливают и пролонгируют действие недеполяризующих миорелаксантов и в гораздо большей степени деполаризующего миорелаксанта бромида суксаметония, не оказывая заметного влияния на токсические эффекты ГД-42 и ДФФ. Защитное действие препаратов АХЭ в отношении ФОИ начинает проявляться при введении фермента в количестве не менее 400 ед./мышь. Установлено, что интервалы времени между внутривенными введениями препарата АХЭ и ФОИ (5, 30, 40 или 60 мин) достоверно не отражаются на выраженности его защитного действия.

Результаты исследования эффективности защиты от ФОИ препаратами АХЭ представлены в табл. 6.

Защитное действие АХЭ наблюдается только в отношении токсических эффектов ГД-42. При введении экзогенной АХЭ в дозах, начиная с 400 ед./мышь, отмечено статистически значимое уменьшение токсичности

этого ингибитора, причем четко выражен дозозависимый характер защитного действия. При введении дозы АХЭ 2000 ед./мышь токсичность ГД-42 снижается в 2,86 раза.

Во всех случаях препараты АХЭ способствовали значительному увеличению продолжительности жизни подопытных животных. Например, при отравлении животных веществом ГД-42 в дозе 1 ЛД₅₀ на фоне введенного фермента в количестве 400 ед./мышь средняя продолжительность жизни животных увеличивалась в 32,9 раза (с 17,3 мин в контроле до 577,7 мин).

В случае ДФФ эффект введения АХЭ даже в дозе 2000 ед./мышь проявляется лишь в незначительном уменьшении токсичности и увеличении продолжительности жизни.

Антидотная активность БуХЭ сыворотки крови лошади. Исследована зависимость защитной эффективности БуХЭ от количества вводимого экзогенного фермента при отравлениях ГД-42 и ДФФ. Препараты БуХЭ вводили в дозах 100, 400 и 2000 ед./мышь внутривенно за 30 мин до введения ингибитора холинэстеразы. Полученные результаты представлены в табл. 7.

Таблица 6

Защитная эффективность АХЭ яда кобры при отравлении ГД-42 и ДФФ (опыты на мышах)

Количество введенной АХЭ, ед./мышь (в/в)	ГД-42		ДФФ	
	ЛД ₅₀ , мг/кг (в/м)	З.И.	ЛД ₅₀ , мг/кг (в/м)	З.И.
Контроль	0,022 (0,021—0,024)	—	3,56 (3,10—3,85)	—
100	~0,02	0,91	3,63 (2,97—3,98)	1,02
200	~0,02	0,91	—	—
400	0,03 (0,027—0,035)	1,36	3,61 (2,41—4,28)	1,01
1200	0,037† (0,054—0,048)	1,85	—	—
2000	0,063 (0,054—0,074)	2,86	3,68 (3,15—4,17)	1,1

Таблица 7

Защитная эффективность БУХЭ сыворотки крови лошади при отравлении ГД-42 и ДФФ (опыты на мышах)

Количество введенной БУХЭ, ед./мышь (в/в)	ГД-42		ДФФ	
	ЛД ₅₀ , мг/кг (в/м)	З.И.	ЛД ₅₀ , мг/кг (в/м)	З.И.
Контроль	0,022 (0,021—0,024)	—	3,56 (3,10—3,85)	—
100	0,021 (0,018—0,025)	0,95	3,60 (3,18—3,91)	1,01
400	0,029 (0,026—0,034)	1,32	3,68 (3,15—3,98)	1,03
2000	0,064 (0,055—0,074)	2,9	4,03 (3,53—4,48)	1,13

Таблица 8

Защитная эффективность холинэстераз (2000 ед./мышь) от токсического действия ФОИ

Фермент	ГД-42		ДФФ	
	ЛД ₅₀ , мг/кг (в/м)	З.И.	ЛД ₅₀ , мг/кг (в/м)	З.И.
Контроль	0,022 (0,021—0,024)	—	3,56 (2,65—3,90)	—
АХЭ из яда кобры	0,063 (0,054—0,074)	2,86	3,68 (3,15—4,17)	1,03
БУХЭ сыворотки крови лошади	0,064 (0,055—0,074)	2,90	4,03 (3,53—4,48)	1,13

Защитное действие БУХЭ начинает проявляться, как и в случае АХЭ, при введении 400 ед./мышь экзогенного фермента только для ГД-42. Токсичность этого ФОИ снижается в 1,32 раза. Введение БУХЭ в количестве 2000 ед./мышь уменьшает токсичность ГД-42 в 2,9 раза. Используемые дозы препаратов БУХЭ не приводят к заметному ослаблению токсического действия ДФФ.

Результаты экспериментов по применению АХЭ и БУХЭ в качестве профилактических средств, предотвращающих токсическое действие ФОИ, обобщены в табл. 8.

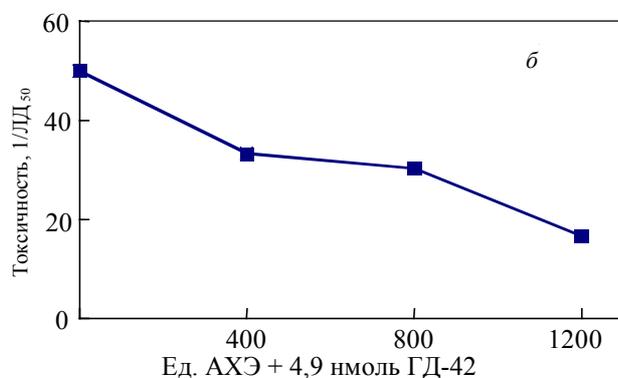
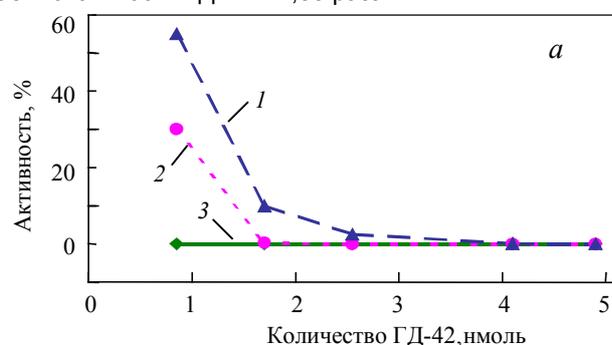
Детоксикация ГД-42 как следствие прямого взаимодействия ФОИ с АХЭ яда кобры. Для доказательства этого предположения были проведены специальные эксперименты.

В одной серии опытов (*in vitro*) растворы АХЭ и ГД-42 разной концентрации инкубировали совместно в течение 40 мин при 20 °С, затем в смесях определяли остаточную активность фермента. Как показали эксперименты, минимальное количество ФОИ, вызывающее полную инактивацию 400, 800 и 1200 ед. фермента, составляет 4,9 нмоль (см. рисунок). Далее инкубационные смеси, содержащие это количество ингибитора, вводили мышам внутривенно и определяли их токсичность.

Как видно из представленных данных, после прединкубации ГД-42 с АХЭ яда кобры наблюдается дозозависимое снижение токсичности ингибитора в 1,50, 1,65 и 3,05 раза при введении фермента в количестве 400, 800 и 1200 ед. соответственно.

Во второй серии опытов (*in vivo*) животным предварительно вводили АХЭ, а затем ингибитор. На основании полученных ранее результатов в этой серии опытов для премедикации была выбрана доза АХЭ, состав-

ляющая 1200 ед./мышь. Введение этой дозы АХЭ снижает токсичность ГД-42 в 1,85 раза.



Защитный эффект АХЭ яда кобры от токсического действия вещества ГД-42:

а — ингибирование АХЭ под действием ГД-42; 1 — 1200 ед. АХЭ; 2 — 800 ед. АХЭ; 3 — 400 ед. АХЭ;

б — токсичность инкубационных смесей АХЭ с ГД-42 для мышей

Таким образом, защитный эффект от профилактического введения АХЭ *in vivo* меньше, чем можно было ожидать по результатам экспериментов *in vitro*. Для выяснения причин указанных различий в результатах экспериментов *in vitro* и *in vivo* необходимо проведение специальных исследований.

Эксперименты *in vitro* тем не менее однозначно свидетельствуют о том, что нейтрализация токсического действия ФОИ обусловлена прямым взаимодействием экзогенного фермента и ингибитора.

Заключение

Результаты исследования антидотной активности ацетилхолинэстеразы из яда кобры и бутирилхолинэстеразы сыворотки крови лошади показывают, что эффективность профилактики отравления фосфорорганическими ингибиторами не зависит от типа холинэстеразы и источника выделения фермента. Профилактика отравлений фосфорорганическими ингибиторами путем предварительного введения экзогенных холинэстераз эффективна лишь в случае попадания в организм животных высокотоксичных веществ, действующие дозы которых очень малы. Только в этих случаях можно искусственно создать в крови животных требуемое стехиометрическое соотношение между токсикантами и токсикант-инактивирующими экзогенными ферментами, что и обеспечивает защитный эффект.

Применение экзогенных холинэстераз для предотвращения отравлений низкотоксичными веществами, поражение которыми обусловлено действием больших доз, не эффективно, что наглядно показано в экспериментах с диизопропилфторфосфатом.

Авторы выражают благодарность сотрудникам Института органической и физической химии Казанского научного центра РАН проф. В.С. Резнику и канд. хим. наук В.Д. Акамсину и И.В. Галяметдиновой за предоставление образца вещества, использованного в экспериментах по аффинной хроматографии.

Авторы признательны сотрудникам МНТЦ д-ру Д. Гибинку и д-ру К.С. Бунятову за содействие, поддержку и постоянное внимание при выполнении проекта.

Исследования проводились в рамках проекта МНТЦ № 162 «Медико-биологические и аналитические аспекты проблемы химической безопасности биосферы».

ЛИТЕРАТУРА

1. Gu Du-Xin, CB Medical Treatment Symposium, 5—8 Dec. 1994, Spiez, Switzerland, p. 2—3.
2. Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare. Eds F.R. Sidell, E.T. Takafuj, D.R. Franz. Washington: W.Reed Army Medical Center, Washington, D.C., USA, 1997, p. 129—180.
3. Randjelovic S., Boskovic B., Todorovic V. e. a. Proc. of the 6-th Int. Symp. on Protection against Chemical and Biological Warfare Agents, 10—15 May 1998, Stockholm, Sweden, p. 213.
4. Luo C., Saxena A., Garcia G. e. a. Proc. of CB Medical Treatment Symp., 7—12 May 2000, Spiez, Switzerland, p. 45.
5. Somani S.M., Dube S.N. Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol., 1989, v. 27, p. 365—387.
6. Harris L.W., Anderson D.R., Zennox W.J. e. a. Drug. Chem. Toxicol., 1991, v. 14, p. 265—281.
7. Das Gupta S., Ghosh A.K., Chowdhri B.L. e. a. Ibid., 1991, v. 14, p. 283—291.
8. Lennox W.J., Harris L.W., Solana R.P. e. a. Ibid., 1992, v. 15, p. 271—183.
9. Somani S.M., Solana R.P., Dube S.N. Chemical Warfare Agents, San Diego, Acad. Press, 1992, p. 67—123.
10. Kassa J., Baigar J. Hum. Exp. Toxicol., 1995, v. 14, p. 923—928.
11. Dawson R. M. J. Appl. Toxicol., 1994, v. 14, p. 317—331.
12. Spohrer U., Thiermann H., Klimmek e. a. Arch. Toxicol., 1994, v. 68, p. 480—489.
13. Van-Helden H.P.M., Van-der Wiel L.J., Zijlstra J.J. e. a. Ibid., 1994, v. 68, p. 224—230.
14. Lau wai- Mau. Gen. Pharmacol., 1993, v. 24, p. 1513—1519.
15. Doctor B.P., Raver Z., Wolfe A. D. e. a. Neurosci. Biobehav. Rev., 1991, v. 15, p. 123—128.
16. Jentry M.K., Gold M.B., Solana B.P. e. a. Toxicol. Appl. Pharmacol., 1992, v. 115, p. 44—49.
17. Jentry M.K., Hartgrafes S.Z., Doctor B.P. Ibid., 1992, v. 117, p. 189—193.
18. Broomfield C.A., Maxwell D.M., Solana R.P. e. a. J. Pharmacol. Exp. Ther., 1991, v. 259, p. 633—638.
19. Ashani Y., Rothschild N., Segall Y. e. a. Life Sciences, 1991, v. 49, p. 368—374.
20. Ashani Y., Shapiro S., Doctor B.P. e. a. Proc. of the 3-rd Int. Symp. on Protection against Chemical Warfare Agents., Umea, Sweden, 1989, p. 227—234.
21. Хухо Ф. Нейрохимия: Основы и принципы. М.: Мир, 1990, с. 209.
22. Raba R., Aviksaar A., Raba M. e. a. Eur. J. Biochem., 1979, v. 96, p. 151—158.
23. Lockridge O., La Du B.N. J. Biol. Chem., 1978, v. 253, p. 361—368.
24. Grishin E.V., Sukhikh A.P., Ovchinnikov Yu.A. Animal, plant and microbial toxins, 1976, v. 2, p. 15—26.
25. Патент Великобритании № 601210.
26. Волкова Р.И., Годовиков Н.Н., Кабачник М.И. и др. Вопросы медицинской химии, 1961, т. VII, вып. 3, с. 250.