

ПРОФИЛАКТИКА И ЛЕЧЕНИЕ ОТРАВЛЕНИЙ

ИССЛЕДОВАНИЕ КИНЕТИКИ ОКСИМ-ИНДУЦИРОВАННОЙ РЕАКТИВАЦИИ ХОЛИНЭСТЕРАЗЫ, ИНГИБИРОВАННОЙ МАЛАТИОНОМ

М. А. Юдин, Д. В. Лантухов, Н. Г. Венгерович¹

В опытах *in vitro* изучена кинетика оксим-индуцированного восстановления холинэстеразы, ингибированной малатионом. Показано, что оксимы не восстанавливают активность угнетенной бутирилхолинэстеразы. Максимум реактивации (в течение 5 мин) ацетилхолинэстеразы регистрировали при применении дипироксима (32,5 %), прапидоксима (18 %), карбоксима (16 %) в концентрации $2,5 \cdot 10^{-4}$ моль/л и токсогонина (26 %) в концентрации $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л. Наибольший аффинитет в отношении фосфорилированного фермента проявлял токсогонин, тогда как для дипироксима характерна высокая оксимная реактивность. Выраженная реактивационная способность этих препаратов ($k_R \geq 2300$ моль⁻¹ · мин⁻¹) позволяет рассматривать их в качестве перспективных средств для лечения отравлений малатионом.

Ключевые слова: отравление; малатион; оксимы; реактивация холинэстеразы

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы в России наблюдается заметное снижение частоты отравлений малатионом (карбофос). В то же время этот инсектицид продолжает использоваться в развивающихся странах, доступен для потребления и может применяться с диверсионно-террористическими целями [5]. Эффективность современных схем терапии отравлений малатионом остается весьма низкой (индекс защиты атропина и дипироксима не превышает 2). Однако при отравлении крыс паратионом показатель этих же комбинаций достигал 9 – 10 [9].

Реактивация фермента при отравлениях органофосфатами, в том числе малатионом, является ведущим направлением при проведении мероприятий неотложной помощи пораженным [4]. Их эффективность во многом определяется как сроками оказания терапии, параметрами сродства яда к холинэстеразе (ХЭ), так и особенностями взаимодействия реактиваторов ХЭ (рХЭ) с фосфорилированным ферментом [7, 10]. В свою очередь способность рХЭ к реактивации фермента обусловлена особенностями их структуры, пространственной ориентацией молекулы, расположением оксимных группировок, электростатическим эффектом и гидрофобным взаимодействием [2].

На сегодняшний день за рубежом в качестве “золотого стандарта” лечения интоксикаций органофосфатами рассматривают применение прапидоксима [6], однако данные о его эффективности при отравлении малатионом противоречивы. В то же время выбор того или иного рХЭ для лечения отравлений малатионом должен основываться, в первую очередь, на данных анализа кинетики восстановления активности ХЭ. В связи с этим цель исследова-

ния состояла в определении перспективных рХЭ для терапии отравлений малатионом по результатам оценки кинетики оксим-индуцированной реактивации ХЭ в опытах *in vitro*.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучали эффективность моно- (прапидоксима (2-гидрокси-иминометил-1-метилпиридин хлорид)) и дипиридиновых оксимов (дипироксима (1,3-бис(4-гидроксииминометилпиридин) пропан ди-бромид), токсогонина (1,3-бис(4-гидроксииминометилпиридин)-2-оксапропан дибромид), карбоксима (1,4-метил-5-[2-(бензилдиметил-аммоний)этил] карбамоилпиридин-2-альдоксим дихлорид)).

Способность оксимов восстанавливать активность ХЭ исследовали методом Элмана. Ацетил-ХЭ эритроцитов электрического органа ската и бутирил-ХЭ сыворотки крови лошади с удельной активностью 0,05 Е/мг ингибировали малатионом на 70 – 80 %. В раствор с неактивным ферментом вносили растворы рХЭ в различных концентрациях 10^{-6} – $5 \cdot 10^{-2}$ моль/л, субстрат (ацетил- или бутирилтиохолин йодид в концентрации 0,02 моль/л) и реактив Элмана (5,5'-дитиобис-(2-нитро-бензойная кислота), $2 \cdot 10^{-3}$ моль/л). Через 2, 5, 10 мин инкубации при температуре 37 °С в среде 0,04 моль/л фосфатного буфера при pH 7,5 определяли скорость реакции по количеству гидролизованного ацетил- и бутирилтиохолин йодида [3]. Аналогично определяли ферментативную активность в отсутствие рХЭ. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре Hitachi U-2900 при длине волны 412 нм.

Степень реактивации (%) рассчитывали по формуле:

$$\text{реактивация} = (1 - (V_o - V_i) / (V_o - V_i)) \cdot 100, \quad (1)$$

где V_o — скорость гидролиза субстрата в отсутствие ингибитора (опт. пл.); V_i — скорость гидролиза субстрата

¹ Научно-исследовательский испытательный институт военной медицины Военно-медицинской академии им. С. М. Кирова, 195043, Санкт-Петербург, ул. Лесопарковая, 4.

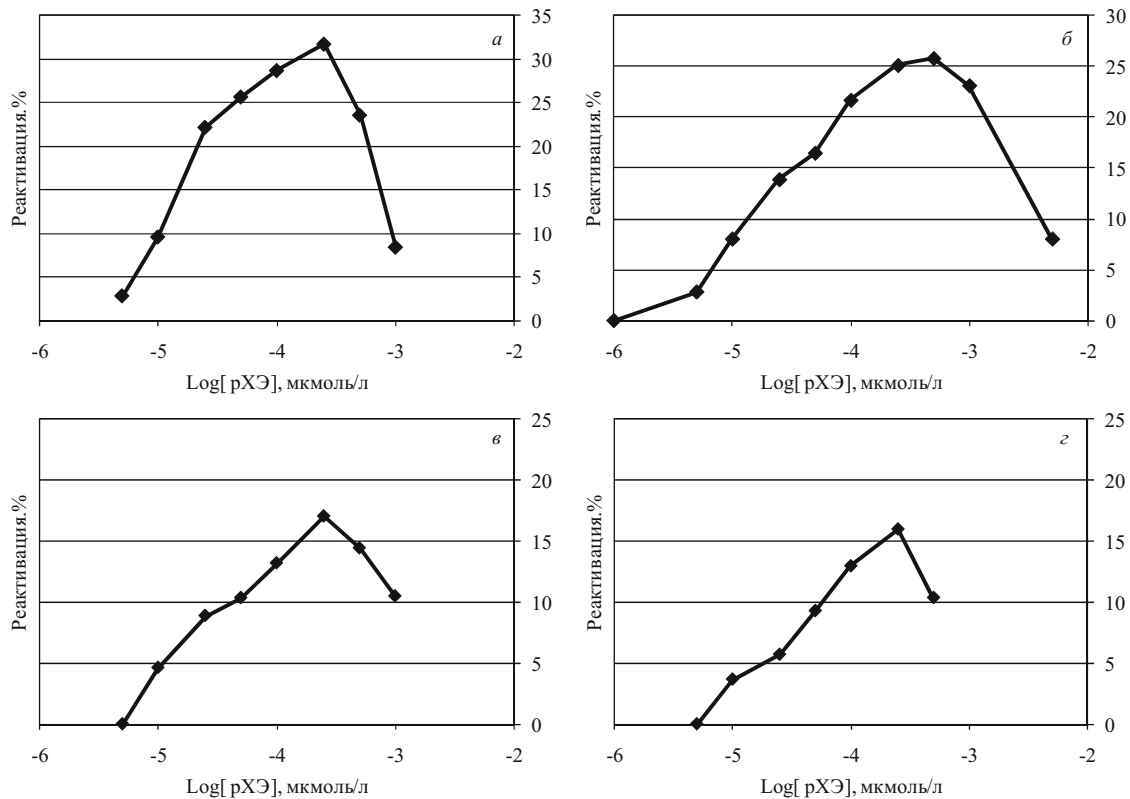


Рис. 1. Полулогарифмическая зависимость реактивации ацетил-ХЭ от концентрации оксидов (*a* — дипироксим, *б* — токсогонин, *в* — пралидоксим, *г* — карбоксим).

после взаимодействия фермента с ингибитором (опт. пл.); V_t — скорость гидролиза субстрата в присутствии рХЭ (опт. пл.).

Расчет константы первого порядка (K_{obs}) проводили по формуле:

$$K_{obs} = -\ln((V_o - V_t)/(V_o - V_i))/t, \quad (2)$$

где t — время реактивации (мин).

Определение константы второго порядка (k_R) проводили по способу Лайнуивера — Берка. k_R рассчитывали по формуле:

$$k_R = K_f/K_D, \quad (3)$$

где K_D — константа образования, K_f — константа диссоциации комплекса фосфорилированного фермента.

Статистическую обработку проводили в соответствии с общепринятыми методами анализа результатов медико-биологических исследований [1].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Оксимы практически не оказывали влияния на активность бутирил-ХЭ, ингибированной малатионом. Степень реактивации фермента в течение 5 мин при использовании дипироксима и пралидоксима не превышала 2,6 и 5,5 % соответственно. Карбоксим и токсогонин не восстанавливали активность бутирил-ХЭ даже при более длительной инкубации (10 мин). Расчет констант энзим-субстратного взаимодействия по бутирил-ХЭ был невозможен.

Способность рХЭ восстанавливать активность ацетил-ХЭ электрического органа ската характеризовалась бимодальным действием. При их применении в низких концентрациях до $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л (log концентрации от -6 до -3,7) отмечали дозозависимое увеличение скорости реактивации фермента (рис. 1).

Дипироксим и токсогонин по сравнению с пралидоксимом и карбоксимом начинали проявлять активность в более низких концентрациях. Максимум реактивации (в течение 5 мин) ацетил-ХЭ регистрировали при применении дипироксима (32,5 %), пралидоксима (18 %), карбоксима (16 %) в концентрации $2,5 \cdot 10^{-4}$ моль/л, тогда как для токсогонина (26 %) пик соответствовал концентрации $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л. Использование концентрированных растворов с препаратами (10^{-3} моль/л) приводило к снижению их эффективности, что могло быть связано с обратимым ингибированием ацетил-ХЭ.

Кинетика реактивации ацетил-ХЭ определяется реакцией Михаэлиса-Менсена:



где EI — ингибированный фермент (E), A — рХЭ, EIA — промежуточный комплекс, K_D — константа диссоциации ингибированного фермента, K_f — константа деградации промежуточного комплекса.

Константы K_D и K_f определяют образование и диссоциацию комплекса фосфорилированного фермента и величину псевдоконстанты реактивации первого порядка (K_{obs}), которая представляет собой начальную фазу реак-

тивации. Зависимость K_{obs} от различных концентраций рХЭ представлена на рис. 2.

Для большинства исследованных рХЭ отмечали изменение зависимости показателей в сторону уменьшения

влияния больших концентраций препаратов на фермент-субстратное взаимодействие, что могло быть следствием достижения предела скорости реакции. Изменение K_{obs} от концентрации прапидоксима характе-

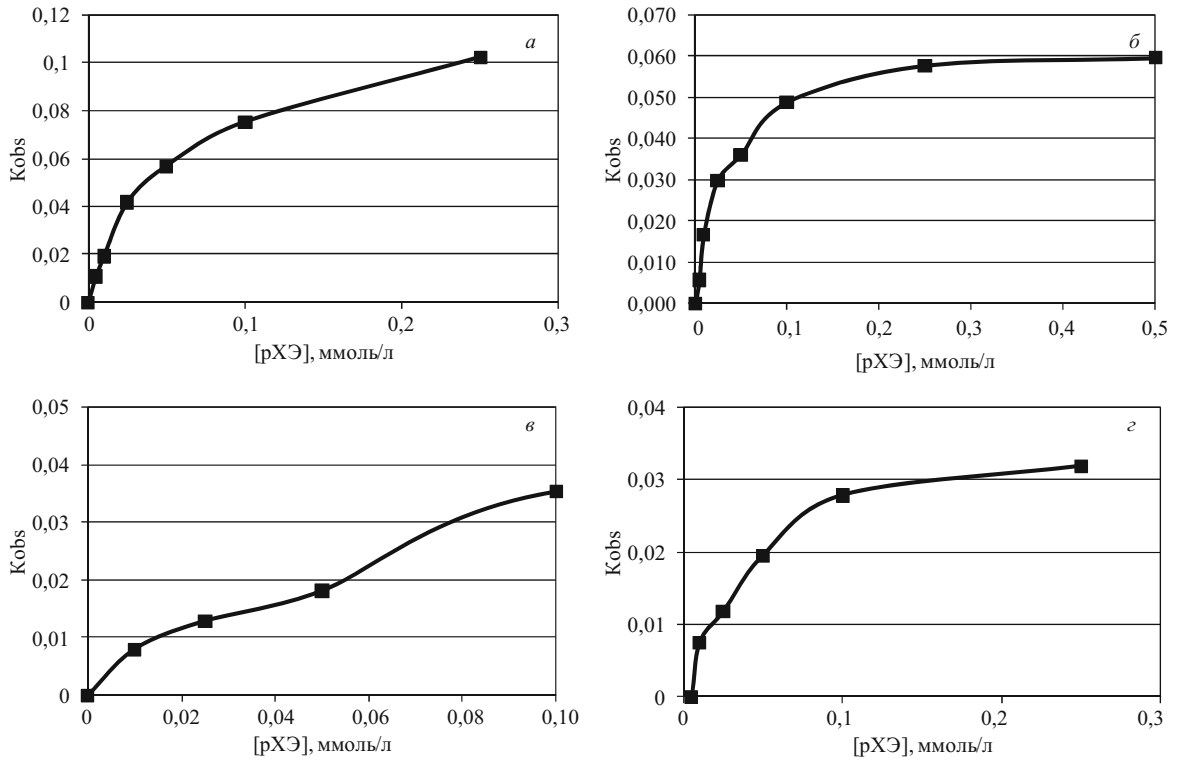


Рис. 2. Зависимость K_{obs} реактивации ацетил-ХЭ от концентрации оксимонов (а — дипироксим, б — токсогонин, в — прапидоксим, з — карбоксим).

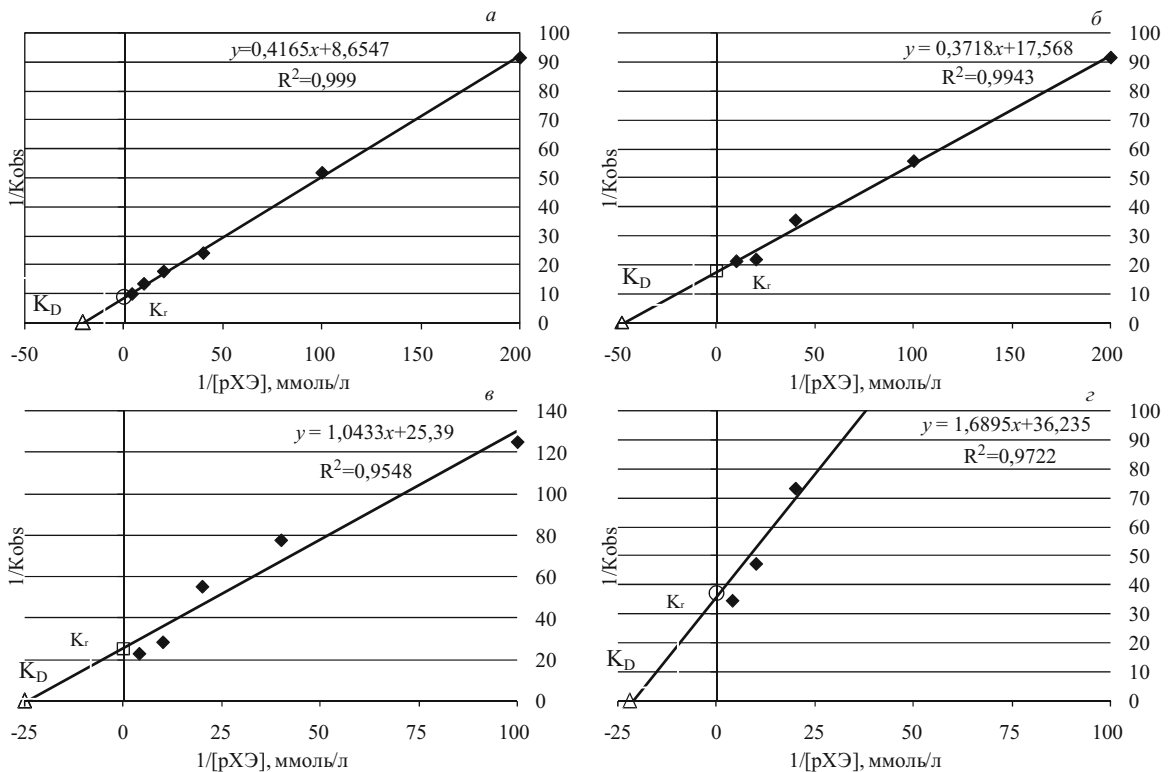
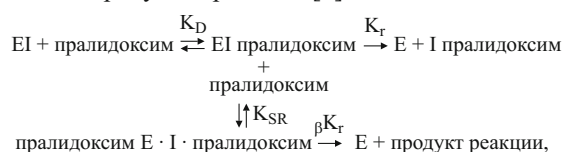


Рис. 3. Парная обратная зависимость оксим-индуцированной реактивации ацетил-ХЭ (а — дипироксим, б — токсогонин, в — прапидоксим, з — карбоксим).

ризовалось практически линейной зависимостью, что могло быть обусловлено как малыми концентрациями использованного препарата, так и следствием протекания реакции по более сложной схеме с образованием дополнительных продуктов реакции [4]:



где K_{SR} — константа диссоциации (образования) комплекса фосфорилированного фермента и рХЭ со второй молекулой пралидоксима, βK_r — константа деградации промежуточного комплекса с двумя молекулами оксима.

Эта реакция определяется возможностью влияния второй молекулы оксима на кинетику фермент-субстратного взаимодействия. Преобразуя K_{obs} и концентрации оксимо в обратные величины получили уравнения регрессии (коэффициент значимости $R_2 > 0,95$) для каждого исследуемого оксима (рис. 3).

Подставляя в уравнения данные рассчитали константу диссоциации промежуточного комплекса (K_D) и константу его деградации (K_r) для каждого оксима (таблица).

K_D дипироксима, пралидоксима и карбоксима не отличались между собой и составили 0,041 – 0,05 ммоль. У токсогонина по сравнению с другими рХЭ этот показатель был более чем в 2 раза ниже. Эти данные свидетельствуют о наличии у препарата высокой аффинности к фосфорилированному комплексу.

K_r — мера внутренней способности оксимо в размещаться на ингибированном ферменте для оптимального взаимодействия оксимной группы рХЭ с фосфорильной группой яда. По величине этого показателя можно заключить, что способность дипироксима связываться с ядом и обеспечивать деградацию промежуточного комплекса с образованием свободной формы фермента более чем 2, 3 и 4 раза выше по отношению к токсогонину, пралидоксиму и карбоксиму соответственно.

По величине истинной константы второго порядка (k_r), которая отражает весь процесс дефосфорилирования яда с фермента, препараты расположились в следующем порядке по убыванию эффективности: токсогонин $>$ дипироксим $>$ пралидоксим $>$ карбоксим. Полученные результаты позволяют рассматривать дипироксим, и в большей степени токсогонин, в качестве перспективных средств лечения отравлений малатионом.

Кинетические параметры оксим-индуцированной реактивации фосфорилированной малатионом ацетил-ХЭ

Группа / препарат	Константы реактивации		
	K_r , мин ⁻¹	K_D , ммоль	k_r , моль ⁻¹ · мин ⁻¹
Дипироксим	0,115	0,05	2300
Токсогонин	0,057	0,02	2850
Пралидоксим	0,039	0,041	950
Карбоксим	0,028	0,047	590

ВЫВОДЫ

1. Исследованные оксимо не влияют на активность бутирилхолинэстеразы, ингибированной малатионом.
2. Наибольший аффинитет в отношении фосфорилированной ацетилхолинэстеразы проявляет токсогонин ($K_D = 0,02$ ммоль), тогда как для дипироксима характерна высокая оксимная реактивность ($K_r = 0,115$ мин⁻¹).
3. По реактивации ингибированной ацетилхолинэстеразы (k_r , моль⁻¹ · мин⁻¹) препараты располагаются в следующем порядке по убыванию эффективности: токсогонин (2850) $>$ дипироксим (2300) $>$ пралидоксим (950) $>$ карбоксим (590).

ЛИТЕРАТУРА

1. С. Гланц, Пер. с англ., *Практика*, Москва (1998).
2. D. Bieger, *J. of Pharmacy and Pharmacology*, **19**, 844 – 847 (1967).
3. G. L. Ellman, K. D. Courtney, V. Andres, *Biochem. pharmacol.*, **7**, 88 – 95 (1961).
4. C. Gupta, *Handbook of toxicology of chemical warfare agents*, Elsevier, London (2009).
5. M. Jokanovic, *Toxicol Lett*, № 190 (2), (2009).
6. K. Kuka, M. Hrabnova, O. Soukup, et al., *Bratisl. Lek. Listy*, **111**(9), 502 – 504 (2010).
7. C. Luo, M. Tong, N. Chilukuri, et al., *Biochemistry*, **46**, 11771 – 11779 (2007).
8. P. Masson, M-T. Froment, C. F. Bartels, et al., *Biochem. J.*, **325**, 53 – 61 (1997).
9. L. Musilova, K. Kuca, Y. Jung, et al., *Clin. Toxicol. (Phila)*, **47**, 545 – 550 (2009).
10. C. Ramesh, N. Gupta, A. Dekundy, *Drug Development Research*, **64**, 71 – 81 (2005).

Поступила 06.02.12

STUDYING KINETICS OF OXIME-INDUCED REACTIVATION OF MALATHION-INHIBITED CHOLINESTERASE

M. A. Yudin, D. V. Lantukhov, and N. G. Vengerovich

Experimental Research Institute of Military Medicine, Military Medical Academy, ul. Lesoparkovaya 4, St. Petersburg, 195043, Russia

The kinetics of oxime-induced reactivation of malathion-inhibited cholinesterase has been experimentally studied *in vitro*. It is shown that oximes do not restore the activity of inhibited butyrylcholinesterase. Acetylcholinesterase reactivation peak (5-mins long) was found to take place upon introduction of dipyroxime (32.5%), pralidoxime (18%), carboxyme (16%) at a concentration of 2.5×10^{-4} mol/l or toxogonine (26%) at a concentration of 5×10^{-4} mol/l. Toxogonine demonstrated the maximum affinity to phosphorylated enzyme, while dipyroxime is characterized by a high reactivity with respect to oxime. Significant reactivating ability of these preparations ($kR \sim 2300$ mol⁻¹ min⁻¹) makes them promising solution for the treatment of malathion intoxication.

Keywords: intoxication; malathion; oximes; cholinesterase reactivation