

БІОМАРКЕРИ ЕКСПОЗИЦІЇ ТА ЕФЕКТУ ФОСФОРОРГАНІЧНИХ СПОЛУК (огляд даних літератури та результати власних досліджень)

О.В. Федченко, П.Г. Жмінько

ДП "Науковий центр превентивної токсикології, харчової та хімічної безпеки
імені академіка Л.І.Медведя МОЗ України", м. Київ, Україна

РЕЗЮМЕ. *Мета дослідження:* аналіз та узагальнення даних літератури і власних досліджень щодо можливостей використання біомаркерів експозиції та ефекту фосфорорганічних сполук (ФОС), визначення імунологічних біомаркерів ефекту за впливу ФОС, що викликають віддалену нейротоксичну дію (ВНД).

Матеріали і методи. У роботі використані аналітичні методи: збір наукової інформації за проблемою, аналіз даних та наукове узагальнення результатів. Проведена переоцінка впливу ФОС, що викликають ВНД, з позиції визначення найбільш інформативних імунологічних біомаркерів ефекту відомих нейротоксикантів. Проаналізовано результати дослідження впливу на імунну систему нейротоксичних ФОС, ТОКФ і афосу, виконаних на найбільш чутливій моделі – курях породи Leggorn в ізотоксичних дозах (500 мг/кг і 200 мг/кг відповідно) з використанням загальноприйнятих методів імунотоксикології.

Результати дослідження та висновки. В статті проаналізовано та узагальнено дані сучасної літератури щодо обґрунтованого використання біомаркерів експозиції та ефекту ФОС, які широко розповсюджені в об'єктах навколишнього середовища та є однією з причин гострих та хронічних отруєнь серед населення. Розглянуто проблеми необхідності впровадження науково обґрунтованого підходу до розробки та оцінки біомаркерів, а також створення уніфікованого діагностичного комплексу, який включатиме біомаркери експозиції, специфічної та неспецифічної дії, матиме значно більші діагностичні можливості у порівнянні з визначенням окремих показників, що буде основою діагностики, ефективного лікування та прогнозування наслідків отруєнь ФОС. На підставі результатів власних досліджень запропоновано застосування деяких показників у якості імунологічних біомаркерів ефекту ФОС, що володіють ВНД: рівень дрібнодисперсних циркулюючих імунних комплексів у сироватці крові та рівень аутоантитіл до тканин головного мозку; кількість та функціональна активність нейтрофілів крові; кількість Т- і В-лімфоцитів та їхня функціональна активність; кількість НК-клітин, Т-хелперів і Т-супресорів.

Ключові слова: фосфорорганічні сполуки, експозиція, віддалена нейротоксична дія, діагностика, біомаркери

Фосфорорганічні сполуки (ФОС) – це велика група хімічних речовин, що являють собою складні ефіри, аміди або тіолові похідні фосфорної, алкілфосфорної, тіофосфорної та тіофосфонові кислот. ФОС широко застосовуються протягом багатьох років: у сільському господарстві – з метою захисту рослин та тварин у якості інсектицидів, акарицидів, нематоцидів та гербіцидів, у хімічній промисловості – у якості розчинників та пластифікаторів, у фармацевтичній промисловості – як компоненти лікарських засобів, у військовій сфері – як бойові отруйні речовини [1-6].

Згідно з оцінками ВООЗ, 3 млн. людей щороку страждають від гострих отруєнь ФОС, при цьому для 200 000 осіб отруєння мають летальні наслідки [5, 7].

Протягом останніх двох десятиліть саме фосфорорганічні пестициди є однією з основних причин гострих та хронічних

отруєнь пестицидами серед працівників сільського господарства, серед населення при побутовому використанні у якості інсектицидів, а також під час випадкового чи навмисного застосування, що потребує екстреної медичної допомоги, точної діагностики, ефективного лікування та прогнозу наслідків інтоксикації [4, 6, 8-11].

ФОС є пестицидами, що найбільш активно використовуються в усьому світі, тому їх залишки та метаболіти широко розповсюджені в об'єктах довкілля, посилюючи при цьому загальний тягар негативного впливу хімічних факторів на здоров'я людей та екологічних систем [2, 4, 6, 8, 12, 13].

ВООЗ зазначає, що людина піддається впливу ФОС через споживання їжі, напоїв та під час вдихання забрудненого повітря (рис. 1) [13].

Так, результати нещодавно проведеного

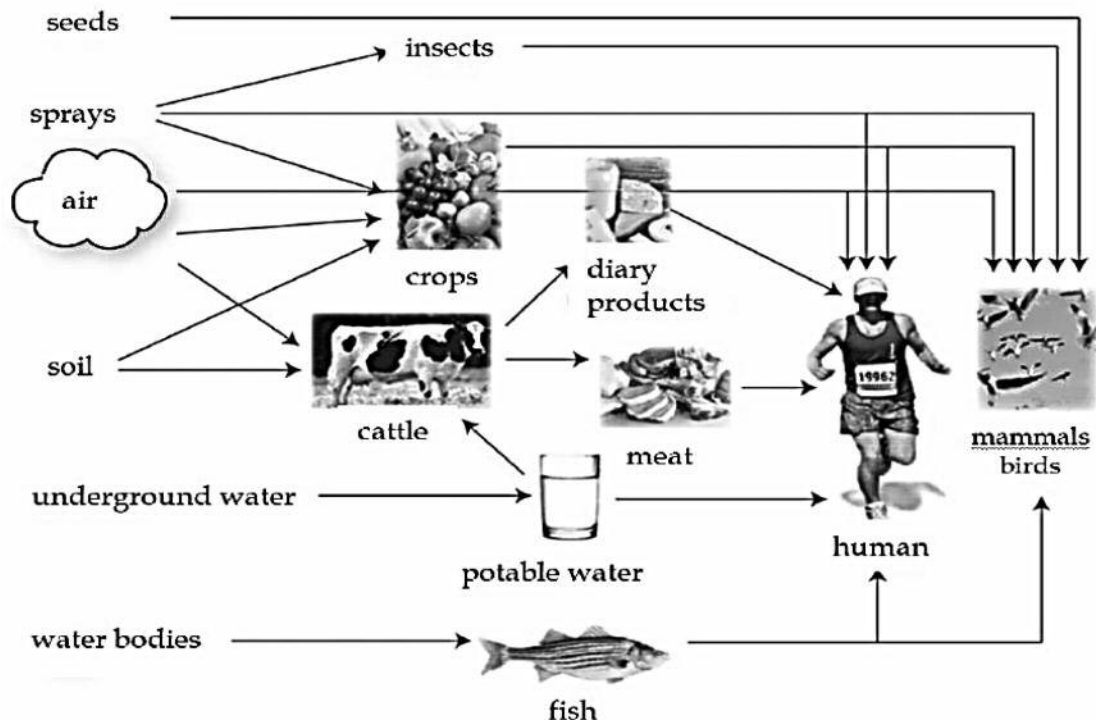


Рис. 1. Шляхи експозиції ФОС (Routes of exposure to OPs, adapted from WHO, 2001) [13].

дослідження взаємозв'язку між особливостями харчування канадської популяції (5604 осіб віком 6–79 років) та концентраціями метаболітів ФОС (діалкілфосфатів) у сечі, свідчать про те, що понад 90 % учасників мали хоча б один тип діалкілфосфатів у зразках сечі. Крім того, виявлено прямий взаємозв'язок між кількістю вживання овочів та концентрацією діалкілфосфатів, що є підтвердженням того, що ефективно регулювання використання пестицидів буде запорукою зниження їхнього негативного впливу та асоційованого з ним ризику для здоров'я населення [14].

Отже, в умовах реальної глобальної загрози життєдіяльності людини потрібно вживати активних заходів зі зниження до мінімального ризику дії небезпечних хімічних факторів, якими є, в числі інших, ФОС [4, 8, 15]. Крім того, підвищення активності міжнародного тероризму збільшує ризик використання як відомих фосфорорганічних отруйних речовин, так і нових сполук з невідомою хімічною структурою та обґрунтовує необхідність наукових розробок стратегії ефективного захисту здоров'я людей у випадку можливої дії фосфорорганічних агентів [3, 16].

Для оцінки експозиції та ризику щодо експонованих суб'єктів важливе значення

має біомоніторинг – систематичні безперервні або періодичні заходи з відбору біопроб для аналізу концентрацій ксенобіотиків, їхніх метаболітів або визначення специфічних параметрів біологічних ефектів, так званих біомаркерів [7, 17, 18].

Визначення незмінених ФОС та їх метаболітів у біологічних матрицях (кров, сеча тощо) проводиться для підтвердження експозиції у випадку гострих отруєнь, але цей метод має обмеження, яке пов'язане з тим, що незмінені ФОС швидко зникають із крові та виводяться із сечею з організму [19].

Традиційні біомаркери інтоксикації ФОС, що широко використовуються – визначення активності ацетилхолінестерази (АХЕ/AchE) та бутирилхолінестерази (БХЕ/BChE), мають специфічність лише в ранні терміни інтоксикації, а кількість наукових робіт з визначення чутливості, специфічності та прогностичної значущості цих показників досить обмежена. Крім того, за хронічної інтоксикації невеликими дозами ФОС, наявність клінічних симптомів може не супроводжуватись інгібуванням холінестераз, тому рівень активності цих ферментів не може слугувати універсальним біомаркером інтоксикації. Також деякі вікові зміни та особливості організму, наявність супутніх гострих або

хронічних захворювань та вплив різноманітних екзогенних факторів можуть супроводжуватись неспецифічними змінами ряду біохімічних показників, в тому числі зниженням активності холінестераз, що інколи помилково розцінюється як ознака інтоксикації ФОС [20].

Метою будь-якої діагностики є виявлення порушення стану організму, про що свідчить зміна комплексу гематологічних, біохімічних, імунологічних та інших показників-біомаркерів. Ці дані необхідні для подальшої корекції виявлених порушень та прогнозування наслідків. У випадку інтоксикацій ксенобіотиками, в тому числі ФОС, спостерігаються зміни багатьох показників (іноді деякі з них можуть знаходитись у межах нормальних або граничних значень), але аналіз цих показників-біомаркерів у сукупності може значно підвищити якість діагностики завдяки більшій чутливості та специфічності у порівнянні з визначенням окремих показників. Оскільки в сучасній науці багато уваги приділяється пошуку нових одиничних маркерів, існує необхідність створення комплексу інтегральних біомаркерів експозиції та ефекту, що відображають взаємодію різних систем організму та мають більшу діагностичну та прогностичну значущість [7, 20].

Зазначається, що процес пошуку біомаркерів часто має безсистемний характер, оскільки їх підбір і встановлення валідності є складним нерегламентованим процесом, що відрізняється для різних біомаркерів [7, 20]. Так, у 2002 році Національним інститутом раку (США) запропоновано новий науково обґрунтований підхід до розробки та оцінки біомаркерів з поетапним переходом від I до V стадії. Стадії включають проведення доклінічних досліджень з метою ідентифікації біомаркерів, клінічні дослідження з метою оцінки відтворюваності результатів у різних лабораторіях, визначення чутливості та специфічності, згодом підтвердження та уточнення цих параметрів на великій вибірці пацієнтів, після чого має бути фінальна оцінка всіх переваг і недоліків біомаркера з обґрунтуванням економічної доцільності його використання [20].

Слід зауважити, що біомаркерам токсичної дії ФОС, що не пов'язані з їхньою

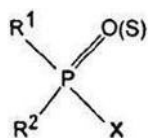
антихолінестеразною дією, приділяється недостатньо уваги. За віддаленої нейротоксичної дії (ВНД) та хронічних інтоксикаціях ФОС, коли специфічній дії передують (або проявляються протягом усього періоду інтоксикації) зміни захисних систем організму, зокрема імунної, визначення таких біомаркерів мало б важливе прогностичне значення.

Мета дослідження: аналіз та узагальнення даних літератури і власних досліджень щодо можливостей використання біомаркерів експозиції та ефекту ФОС, визначення імунологічних біомаркерів ефекту за впливу ФОС, що викликають ВНД.

Матеріали і методи дослідження. У роботі використані аналітичні методи: збір наукової інформації за проблемою, аналіз даних та наукове узагальнення результатів. Здійснено переоцінку впливу ФОС, що викликають ВНД, в раніше проведених дослідженнях з позиції визначення найбільш інформативних імунологічних біомаркерів ефекту відомих нейротоксикантів. Проаналізовано результати дослідження впливу на імунну систему нейротоксичних ФОС: триортокрезил-фосфату (ТОКФ) і О,О-дифеніл-1-ацетокси-2,2,2-трихлоретилфосфонату (афос), які були виконано на найбільш чутливій моделі – курях породи Leggorn в ізотоксичних дозах (500 мг/кг і 200 мг/кг відповідно). В проведеному дослідженні за допомогою загальноприйнятих методів гематології та імунотоксикології [21, 22] визначали показники кількісного і морфологічного складу периферичної крові, показники клітинного і гуморального імунітету: кількість Т-лімфоцитів, В-лімфоцитів, Т-хелперів (Тх), Т-супресорів (Тс) та НК-клітин, функціональну активність Т-лімфоцитів, В-лімфоцитів та нейтрофілів; досліджували рівень циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) у сироватці крові та їхню дисперсність, титри аутоантитіл до антигенів із нервової тканини визначали за реакцією пасивної гемаглютинації по Бойдену.

Результати дослідження та їх обговорення. Згідно з даними літератури, фосфорорганічні сполуки за своєю хімічною будовою відносяться до ефірів тіофосфорної кислоти (тіофос, метафос, меркаптофос), ефірів дитіофосфорної кислоти (карбофос, фосфамід), амідів пірофосфорної кислоти

(октаметил), ефірів алкілфосфорних кислот (хлорофос) [3, 23, 24]. Залежно від відмінностей фосфорної групи відокремлюють 3 основні групи сполук: фосфати (без атома сірки), фосфоротіоати (з одним атомом сірки) та фосфородитіоати (з двома атомами сірки). Загальна схематична формула хімічної будови більшості ФОС виглядає наступним чином [24]:



де R^1 і R^2 – алкільні, алкоксильні, алкіламінні, арильні або арилоксигрупи; група X – залишок неорганічної чи органічної кислоти, з'єднаний з фосфором безпосередньо, або різні аліфатичні ароматичні чи гетероциклічні групи, що з'єднані з фосфором через кисень або сірку; атомом з подвійним зв'язком може бути кисень або сірка. Найвищою антихолінестеразною активністю та токсичністю володіють сполуки, в яких фосфор зв'язаний з атомом кисню ($P=O$), ніж сполуки з атомом сірки ($P=S$). Вища токсичність речовин, що мають зв'язок $P=O$ характеризується меншими величинами летальних доз та більш швидким розвитком їхньої токсичної дії [22].

За своєю токсичністю ФОС поділяють на:

1. Сильнодіючі токсичні речовини (LD_{50} – 10-50 мг/кг) – тіофос, меркаптофос, метилетилтіофос.

2. Високотоксичні речовини (LD_{50} – 50-200 мг/кг) – метилмеркаптофос, фосфамід, ДДВФ, базудин, антіо, цидеал, фталофос, бензофосфат.

3. Помірно токсичні речовини (LD_{50} – 200-1000 мг/кг) – хлорофос, метилнітрофос, карбофос, трихлорметафос-3, сайфос.

4. Малотоксичні речовини (LD_{50} – більше 1000 мг/кг) – вінілфосфат, бромфос, абат, ціанокс, валексон, демуфос [1].

В окрему групу виділяють бойові отруйні речовини (LD_{50} менше 10 мг/кг) – зарин, зоман, VX [3, 25, 26].

Механізм токсичної дії ФОС реалізується завдяки схожості їхньої будови з нейромедіатором ацетилхоліном – природним субстратом AChE. При досягненні активної ділянки AChE, взаємодія ФОС з ферментом зводиться до фосфорилування гідроксилу серину, що призводить до інактивації AChE, накопичення ацетилхоліну в холінергічних синапсах, гіперстимуляції рецепторів, порушення нормального проходження нервових імпульсів та згодом – до блокади проведення нервового імпульсу через синаптичну мембрану [27] (рис.2).

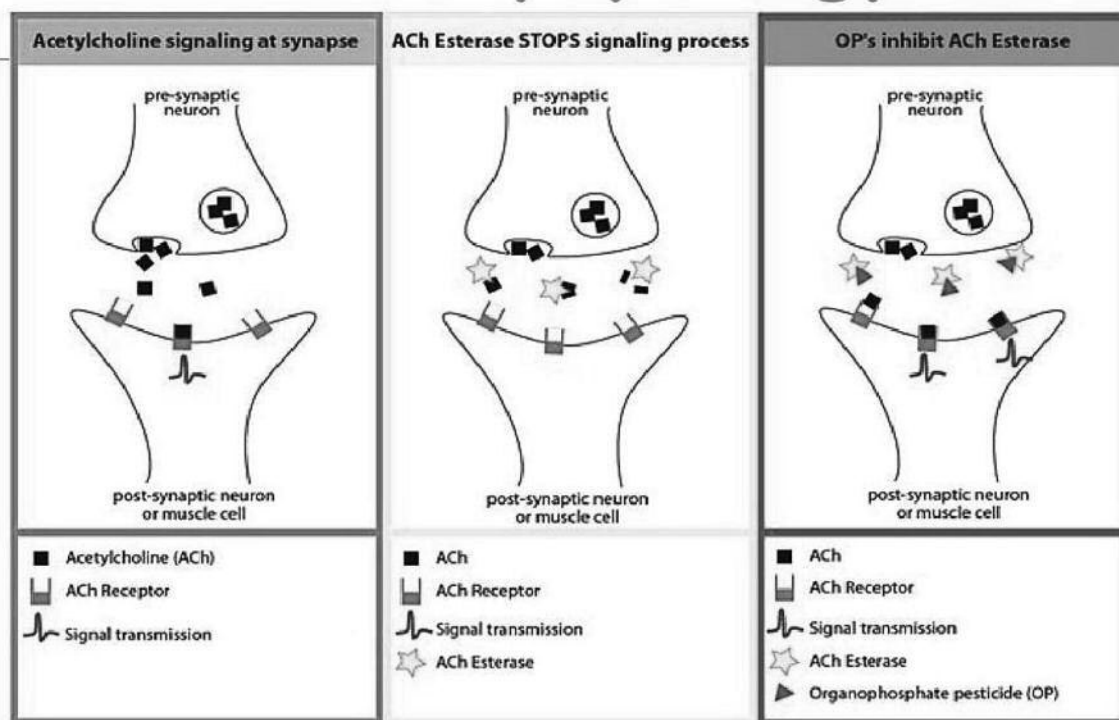


Рис.2. Патолофізіологічні механізми гострої токсичності фосфорорганічних пестицидів [27].

З інгібуванням AchE пов'язана гостра токсичність ФОС. Антихолінергічний ефект залежить від дози ФОС – чим вище доза антихолінергічної речовини, тим більший ступінь інгібування AchE нервової тканини та вираженість інтоксикації. Клінічні симптоми гострої інтоксикації ФОС проявляються в першу добу або протягом декількох діб (у випадку ліпофільних ФОС) у вигляді холінергічного кризу, що обумовлений інгібуванням AchE та накопиченням ацетилхоліну в нервових закінченнях [9, 24].

Симптоми холінергічного кризу при отруєнні ФОС включають: мускаринові ефекти (нудота, блювота, діарея, абдомінальні судоми, нетримання сечі, міоз, бронхорея, бронхokonстрикція, дихальна недостатність, слино-, слюзотеча, гіпотонія, брадикардія, аритмії); нікотинові ефекти (м'язова слабкість, тремор, слабкість і парез діафрагми, гіпертензія, тахікардія, мідріаз); зміни центральної нервової системи (занепокоєння, збуджений стан, головний біль, запаморочення, атаксія, втрата свідомості, судоми, кома).

Перші ознаки холінергічних симптомів з'являються тоді, коли активність AchE в крові знижується до 50 %, а інгібування її активності на 75 % призводить до появи важкого ступеня інтоксикації та вимагає невідкладних заходів [9, 24].

Деякі ФОС різної структури (фосфати, фосфонати, амідфосфати) мають здатність до ВНД. Цей ефект з'являється після певного латентного періоду (14-21 день, можливо, через декілька років після перенесеного гострого отруєння) та характеризується виникненням атаксії, м'язової слабкості, порушенням чутливості та онімінням кінцівок, парезів та паралічів кінцівок (морфологічною картиною при цьому є демієлінізація волокон провідних шляхів спинного мозку і периферичних нервів). До теперішнього часу описані десятки тисяч випадків виникнення парезів і паралічів у людей в результаті дії ФОС (ТОКФ, міпафокс, лептофос, хлорофос та ін.), причому класичним ФОС з ВНД вважається ТОКФ [5, 24, 28, 29].

Механізм ВНД ФОС остаточно не з'ясовано. Відомо, що ВНД не пов'язана з інгібуванням AchE, а в патогенезі ураження нервової системи головне місце нале-

жить фосфорилуванню білка, що відноситься до карбоксилестераз та має назву нейротоксична естераза (НТЕ/НТЕ) [16, 28]. Віддалені нейропатії виникають за умови інгібування активності НТЕ на 70-80%, причому розвиток ВНД пов'язаний не тільки з її пригніченням, але й з наступним «старінням» НТЕ [24].

Поряд із нейротоксичним ефектом, за дії великих доз, ФОС викликають синдром мультиорганної дисфункції з порушенням функції печінки, серця, нирок та інших органів, у розвитку якого відіграє роль холінергічна, цитотоксична, мембранотоксична дія ФОС та окисний стрес з підвищенням активних форм кисню [9].

Біомаркери: сфери застосування та види.

У широкому значенні терміну, згідно з доповіддю Національної академії наук США (1989), біомаркером вважають будь-який кількісний показник, що відображає взаємодію між біологічною системою і потенційною небезпекою, яка може мати хімічну, фізичну чи біологічну природу [7, 17, 19, 20]. Визначення біомаркера як «показника, який можна об'єктивно виміряти та використовувати в якості індикатора фізіологічних і патологічних біологічних процесів або фармакологічних відповідей на терапевтичне втручання» надає робоча група Національного Інституту Здоров'я США (National Institute of Health, USA) у 2001 році [20, 30].

Сфери застосування біомаркерів:

- використання у клінічній практиці (для підтвердження діагнозу гострого чи хронічного отруєння, оцінки ефективності лікування та прогнозу);
- оцінка ризику для здоров'я (оцінка експозиції працюючих на виробництві, аналіз ефективності захисних заходів із оздоровлення виробничих процесів та умов праці);
- використання з метою моніторингу (для скринінгу на індивідуальному і популяційному рівнях для підтвердження експозиції осіб у даній популяції).
Ідеальний біомаркер повинен відповідати наступним характеристикам:
- отримання проб та їх аналіз прості та надійні;
- висока чутливість, специфічність та прогностична значущість;
- відображення субклінічних та зворотніх змін;

- існують відповідні ефективні засоби втручання та превентивні заходи;
- надійне відтворювання у людей різної статі та різних етнічних груп;
- невисока вартість визначення біомаркера, а процедура визначення безпечна для здоров'я пацієнтів та обґрунтована принципами біоетики [20].

Відокремлюють наступні види біомаркерів [7, 19, 31, 32, 33] (рис. 3):

1. Біомаркер експозиції (Biomarker of Exposure): екзогенна речовина, його метаболіт або продукт взаємодії між ксенобіотиком та будь-якою молекулою або клітиною-мішенню, які визначаються в тому чи іншому відділі організму.

2. Біомаркер ефекту (Biomarker of Effect): вимірні біохімічна, фізіологічна, поведінкова або інша зміна в організмі, яку можна вважати пов'язаною із заздалегідь відомим або можливим порушенням здоров'я або захворюванням.

3. Біомаркер чутливості (Biomarker of Susceptibility): індикатор, притаманний організму або набутої їм здатності реагувати на дію певної речовини-ксенобіотика.

Слід зазначити, що чітко розподілення біомаркерів за видами часто неможливе [32] (рис. 3).

Біомаркери експозиції ФОС. У якості біомаркерів експозиції, що підтверджують наявний факт дії ФОС на людей, розглядають:

1. Хімічні речовини (табл. 1) та їх метаболіти (табл. 2) у біологічних матрицях

(кров та її компоненти, сеча, слина, повітря, що видихається, вміст шлунка, тканини) [19].

2. Аддукти, що утворюються в реакціях приєднання між хімічними речовинами та клітинними макромолекулами (білками і ДНК).

Завдяки визначенню біомаркерів експозиції можна прогнозувати ризик, але не завжди отриману інформацію можна використовувати для передбачення токсичного ефекту (Benford et al., 2000) [19].

Визначення незмінених ФОС у крові, сечі, шлунковому вмісті має діагностичну цінність для підтвердження експозиції у випадку гострих отруєнь, але для біомоніторингу професійної експозиції є обмеження, оскільки ФОС швидко зникають із крові та виводяться із сечею, при цьому концентрації часто є занадто низькими, щоб їх можна було виявити [19].

На основі фармакокінетичних моделей і даних біомоніторингу встановлено, що концентрації ФОС у тканинах людини вище 100 мкМ (10-100 мкг/мл) відображають гостру (випадкову або навмисну) експозицію, тоді як більш низькі концентрації (0,01-1 мкг/мл) є наслідком впливу забрудненого ксенобіотиком довкілля. Тому визначення концентрації ФОС у крові та сечі використовується для диференціювання між хронічною та гострою експозицією ФОС [10].

Більшість ФОС метаболізуються з утворенням 6-и кінцевих продуктів – діалкіл-

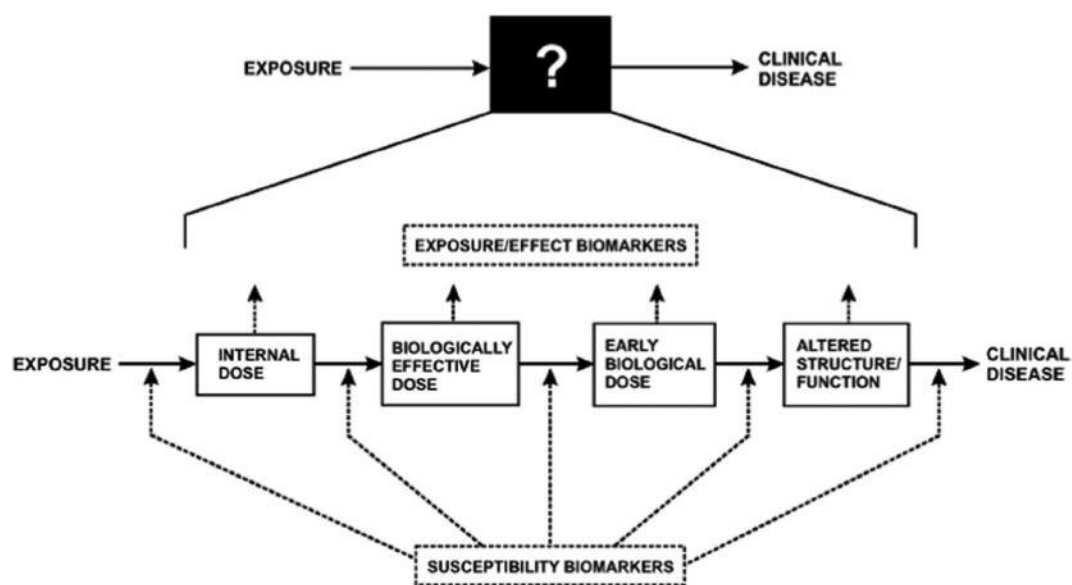


Рис. 3. Оригінальна концепція біомаркерів (NRC, 1987) [32].

**Визначення фосфорорганічних сполук у біопробах людини
[цит. по Manel Araoud, 19]**

Пестицид	Характеристика експозиції	Проба	Аналітичні методи	Посилання
Паратіон-етил	Випадки отруєнь	Сироватка	Газова хроматографія/мас-спектрометрія	E. Lacassie et al., 2001 [цит. по Manel Araoud, 2011]
Фенітротіон, діазинон, ацефат	Випадки отруєнь	Сироватка	Рідинна хроматографія/мас-спектрометрія	S. Inoue et al., 2007 [цит. по Manel Araoud, 2011]
Діазинон, малатіон, хлорпірифос	Професійна експозиція	Сироватка	Газова хроматографія/мас-спектрометрія	A. M. Tsatsakis et al., 2009 [цит. по Manel Araoud, 2011]
18 визначених ФОС 20 визначених ФОС	Хворі з різними причинами смерті	Тканини нирок, печінки, жирова тканина	Газова хроматографія/мас-спектрометрія	M. V. Russo et al., 2002 [цит. по Manel Araoud, 2011]

Таблиця 2

Основні метаболіти фосфорорганічних сполук, що визначаються в сечі людини з метою біомоніторингу [цит. по Manel Araoud, 19].

Метаболіти	Основні вихідні сполуки
Alkylphosphates:	
Dimethylphosphate (DMP)	Malathion, dichlorvos, dimethoate, temephos, fenchlorphos, mevinphos
Dimethylthiophosphate (DMTP)	Azinphos-methyl, dimethoate, fenchlorphos, fenitrothion, malathion
Dimethyldithiophosphate (DMDTP)	Azinphos-methyl, dimethoate, malathion
Diethylphosphate (DEP)	
Diethylthiophosphate (DETP)	Thion, disulfoton, parathion, phorate, terbufos, quinalphos, demeton, diazinon, dichlofenthion
Diethyldithiophosphate (DEDTP)	Diazinon, demethon, parathion, phorate, quinalphos Disulfoton, phorate
Para-nitrophenol (PNP)	Parathion, Parathion-methyl
3,5,6-trichloro-pyridinol (TCP)	Chlorpyrifos, Chlorpyrifos-methyl
3-methyl-4-nitrophenol (MNP)	Fenitrothion
Mono- and Di-carboxylic phosphorus acids	Malathion
Aminomethyl-phosphonic acid	Glyphosate

фосфатів (dialkylphosphates, DAP), які виводяться з сечею: dimethylphosphate (DMP), dimethylthiophosphate (DMTP), dimethyldithiophosphate (DMDTP), diethylphosphate (DEP), diethylthiophosphate (DETP), diethyldithiophosphate (DEDTP) [10, 19, 34]. Визначення алкілфосфатних метаболітів у сечі є найбільш практичним і поширеним методом оцінки внутрішньої (абсорбованої) дози більшості фосфорорганічних пестицидів, тому цей метод застосовується для біомоніторингу експозиції ФОС в епідеміологічних дослідженнях [19]. При цьому необхідно встановити оптимальний час для відбору біопроб та врахувати те, що у деяких випадках рівні DAP є меншими за поріг визначення [10, 19].

Для біомоніторингу експозиції, поряд з DAP, здійснюється визначення в сечі пестицид-специфічних метаболітів, таких як паранітрофенол (paranitrophenol/PNP) і трихлоропіридинол (trichloro-pyridinol/TCP) (табл. 2.) [19].

У різних біомедичних пробах в якості біомаркерів експозиції фосфорорганічних отруйних речовин, таких як зарин, зоман, VX, можуть слугувати метаболіти, що

представлені в узагальненому вигляді у табл. 3 [35].

Увага науковців до визначення аддуктів з білками, як біомаркерів експозиції, аргументується їхньою здатністю до більш тривалого знаходження в організмі. У випадку ФОС та фосфорорганічних отруйних речовин – це аддукти з бутирилхолінестеразою та альбуміном. Але зазначається, незважаючи на можливість сучасних аналітичних методів, пошук аддуктів у віддалені терміни після експозиції є утрудненим у зв'язку з їх невеликою концентрацією в організмі. Крім того, визначення аддуктів все ж таки не дає відповідь на запитання ні про тяжкість, ні про характер отруєння [20].

Відомо, що для більшості ксенобіотиків комплексоутворення з протеїнами має зворотний характер і розцінюється як форма детоксикації. В деяких випадках, зокрема для речовин алкілюючого типу та речовин, які легко піддаються гідролізу, зв'язування з альбуміном підвищує їхню токсичність [36]. Також показано, що зв'язування ФОС з білками сироватки крові сприяє зниженню їхньої токсичності для лабораторних тварин і може обумов-

Таблиця 3

Перелік біомаркерів експозиції фосфорорганічних отруйних речовин [35]

ФОР	ПРОБА	БІОМАРКЕР
Зарин	Сеча, кров	О-ізопропілметилфосфонат
		Метилфосфонова кислота
	Кров (бутирилхолінестераза/ацетилхолінестераза)	Аддукт О-ізопропілметилфосфонат-серин
	Кров (альбумін)	Аддукт О-ізопропілметилфосфонат – тирозин
Зоман	Сеча, кров	О-пінаколілметилфосфонат
		Метилфосфонова кислота
	Кров (бутирилхолінестераза/ацетилхолінестераза)	Аддукт О-пінаколілметилфосфонат – серин
	Кров (альбумін)	Аддукт О-пінаколілметилфосфонат – тирозин
VX	Сеча, кров	О-етилметилфосфонат
		Метилфосфонова кислота
	Кров	Діізопропіламіноетилтіометан
	Кров (бутирилхолінестераза/ацетилхолінестераза)	Аддукт О-етилметилфосфонат – серин

лювати видову чутливість до дії ксенобіотиків [37]. За дії ФОС сорбція на білках спрямована на їхню детоксикацію, оскільки зв'язування з протеїнами крові зменшує вільну концентрацію ксенобіотика, затримує його на периферії і зменшує як антихолінестеразний, так і токсичний ефект. Отже, тривала циркуляція аддуктів ФОС у крові може бути інформативним біомаркером для прогнозування хронічних інтоксикацій. Враховуючи це, можна вважати даний напрямок токсикологічних досліджень перспективним.

Естерази – біомаркери експозиції ФОС. Оскільки в організмі більш стабільними є ферменти, змінені під дією ФОС, у порівнянні з активними речовинами та їх метаболітами, які досить швидко елімінуються, тому визначення активності ферментів є важливим біомаркером експозиції антихолінестеразних речовин [19, 20, 38-40].

Первинними мішенями дії ФОС на організм є ферменти: AchE – мішень гострої токсичної дії та NTE – мішень віддаленої нейротоксичної дії. Вторинні мішені дії ФОС: ферменти VChE і карбоксилестераза (CaE), а також інші білки з естеразною активністю, що ковалентно зв'язують ФОС (ацилпептидгідролаза, гідролаза амідів жирних кислот, арилформамідаза, сироватковий альбумін) [16, 39]. VChE та CaE є стехіометричними акцепторами ФОС, завдяки чому зменшується концентрація активного ФОС для потенційної взаємодії з AchE. Інгібування цих, так званих, нецільових естераз не викликає клінічних ефектів.

Рівень активності холінестераз не щоразу знижується у випадку хронічної інтоксикації малими дозами ФОС, тому не завжди може слугувати надійним біомаркером інтоксикації. Значущість вказаних біомаркерів для діагностики, оцінки ефективності лікування та прогнозування наслідків отруєнь ФОС неоднозначна та широко обговорюється у науковій літературі [16, 19, 20, 38, 39].

Визначення активності AchE. AchE у ссавців знаходиться у ЦНС, периферичній нервовій системі (симпатичні та парасимпатичні ганглії, парасимпатичні нервові закінчення органів, моторні закінчення рухових нейронів), у крові (мембрани еритроцитів). В залежності від видової

належності різні кількості AchE можуть міститись у плазмі: плазма щурів може містити 30–50 % AchE, тоді як у людини цей рівень значно нижчий. Отримані дані свідчать, що структурна та фармакодинамічна схожість між AchE мозку та еритроцитів дає можливість використовувати інгібування AchE еритроцитів для оцінки інгібування AchE мозку [16, 19].

Визначення активності NTE. Визначення активності NTE нервової тканини в якості біомаркера ВНД ФОС обґрунтовано встановленою кореляцією між значним інгібуванням NTE головного мозку експериментальних тварин протягом декількох годин після введення нейротоксичних ФОС та розвитком через декілька тижнів віддаленої нейропатії [16, 28, 39]. У дослідженнях показано, що в перші години після введення нейротоксикантів, паралельно з інгібуванням NTE головного мозку, спостерігається інгібування NTE лімфоцитів і тромбоцитів [28]. Біомоніторинг токсичної дії нейротоксичних ФОС практично не застосовується, хоча існують методики визначення NTE формених елементів крові.

Крім того, результати експериментальних досліджень показали кореляцію між інгібуванням NTE в мозку, лімфоцитах і цілісній крові. На даний час розробляються методики з використанням високочутливих біосенсорів для визначення активності NTE в цілісній крові, які відрізняються простотою приготування зразків крові для біосенсорного аналізу NTE [28, 40].

Визначення активності нецільових естераз. Дані літератури свідчать, що нецільові естерази є першими зв'язуючими ділянками взаємодії ФОС після їхнього потраплення в кров, окрім цього, в умовах *in vitro* багато ФОС взаємодіють з VChE і CaE більш ефективно, ніж з AchE [16, 39, 41]. Автори вважають, що нецільові естерази є більш чутливими біомаркерами, ніж AchE еритроцитів, що дозволяє виявляти експозицію більш низьких доз ФОС.

VChE міститься в різноманітних тканинах ссавців (печінка, серце, ендотелій судин, нервова система та плазма крові), бере участь у процесах метаболізму широкого спектру субстратів ендогенного і екзогенного походження та біотрансформації ксенобіотиків. У присутності VChE неактивні попередники багатьох лікарсь-

ких препаратів переходять в активну форму. Визначення активності BChE в плазмі або цілісній крові використовується як чутливий біомаркер експозиції низьких доз ФОС, при цьому відсутній зв'язок між рівнем її активності та тяжкістю інтоксикації [16, 19, 29, 39, 40].

Карбоксилестерази (CaEs) – це велика група ферментів ссавців, що локалізовані в ендоплазматичному ретикулумі та цитозолі клітин багатьох тканин, при цьому максимальна карбоксилестеразна активність виявлена в печінці та плазмі. CaEs беруть участь у процесах метаболічної активації медичних препаратів та в детоксикації деяких ФОС, гідролізуючи їхні карбоксильні зв'язки та переводячи ФОС в неактивний стан. Другий механізм – зв'язування ФОС в активному центрі ферменту, що призводить до зниження концентрації токсиканта у крові [40].

Крім того, здатністю гідролізувати багато ФОС, у тому числі високотоксичні зарин, зоман, VX, володіє сироватковий фермент параоксоназа-1 (PON1), що є компонентом ліпопротеїнів високої щільності. PON1 отримала свою назву завдяки здатності гідролізувати фосфорорганічну сполуку параоксон. Вважається, що фізіологічною функцією PON1 є гідроліз гомоцистеїн-тіолактону, що попереджує гомоцистеїнілювання білків та розвиток атеросклерозу [38]. Встановлено, що PON1 є важливим показником індивідуальної чутливості організму до деяких ФОС (за даними досліджень на тваринах): тварини з низьким рівнем PON1 (птахи) були більш чутливими до дії ФОС у порівнянні з щурами і кроликами. Крім того, рівень активності PON1 низький при народженні, поступово збільшується з віком тварин, що узгоджується з вищою чутливістю молодих тварин до дії ФОС. Враховуючи це, зниження активності PON1 у сироватці з будь-яких причин може призвести до підвищеної чутливості до дії ФОС [16, 19].

Естеразний статус – комплексний біомаркер дії ФОС. Співвідношення активності 4 серинових естераз (AChE, NTE, BChE, CaE), а також сироваткової PON1 у науковій літературі отримало назву «естеразний статус» організму. Естеразний статус є важливим показником, зміни якого є сигналом порушень гомеостазу організму, а у

випадку дії ФОС, окрім підтвердження факту експозиції, естеразний статус визначає чутливість індивідуума до їхньої дії [16, 38-40]. Проведені дослідження продемонстрували, що визначення естеразного статусу організму є більш інформативним біомаркером експозиції ФОС, ніж стандартні тести з визначення активності тих чи інших окремих естераз [39, 40].

Окрім встановлення факту експозиції, визначення естеразного статусу (а саме, одночасне визначення AChE та NTE в крові) дає можливість оцінити ймовірність розвитку ФОС-індукованої віддаленої нейротоксичної дії або гострої холінергічної інтоксикації. Оскільки інгібування естераз крові залежить від дози, тому його рівень дозволяє оцінити рівень дії, тобто провести дозиметрію експозиції ФОС [16, 39].

Встановлена відмінність естеразного статусу у різних видів тварин вказує на те, що різні естерази є специфічними біомаркерами дії ФОС у різних видів. Аналіз естеразного статусу у людей та гризунів показав високий рівень активності PON1 у всіх досліджуваних видів, при цьому естеразна активність у мишей вища, ніж у шурів. Гризуни проявляли високу активність CaE у плазмі, в той час як активність NTE у них значно нижча, ніж у людей. У крові людини естеразна активність представлена, головним чином, PON1 плазми (50-60 мг/л) і BChE плазми (5 мг/л), а також AChE еритроцитів, у той час як активність CaE була незначною [38]. Визначено, що у людей найбільш чутливий біомаркер – BChE, тоді як у мишей – CaE разом з BChE. [16, 39, 40].

Біомаркери ефекту ФОС. Для покращення оцінки можливого ризику для здоров'я біомоніторинг експозиції необхідно доповнювати дослідженнями біологічних ефектів ксенобіотиків – біомоніторингом ефекту.

Біомаркери ефекту включають певні специфічні маркери тканин-мішеней та повинні відображати ранні біохімічні зворотні зміни, які передують структурним або функціональним порушенням. Біомаркер ефекту – показник, що кількісно характеризує фізіологічні, біохімічні та інші зміни в організмі, від ступеня вираженості яких визначається фактичне чи потенційне порушення здоров'я або роз-

виток хвороби. В якості біомаркера ефекту використовується відхилення будь-якого лабораторного показника (біохімічного, імунологічного, цито- та імуногенетичного), що відображує функціональні порушення критичних органів та систем за дії шкідливого чинника або показник фактичної захворюваності за нозологічними формами захворювань, що мають доказовий зв'язок з маркером експозиції. Показник фактичної захворюваності використовується за відсутності можливості кількісного визначення ксенобіотика у біологічному середовищі [31].

Біомаркери ефекту поділяють на специфічні (вказують на біологічний ефект за дії конкретного шкідливого чинника) та неспецифічні (вказують на загальну, комплексну відповідь організму за дії різноманітних шкідливих факторів).

Найбільш інформативні біомаркери ґрунтуються на оцінці показників їхньої специфічної дії [19]. Біомаркерами специфічної дії ФОС є активність ферментів AchE та NTE.

Існує декілька категорій біомаркерів ефекту:

- молекулярні продукти дії: ДНК-аддукти (продукти взаємодії токсиканта зі структурними фрагментами ДНК), глікозильований гемоглобін, продукти приєднання електрофільних сполук до білків та амінокислот, хромосомні зміни;
- ендогенні біомолекули: AchE, гамаглутамілтрансфераза (ГГТ), аланінамінотрансфераза (АЛТ), аспартатамінотрансфераза (АСТ), лактатдегідрогеназа (ЛДГ);
- зміни клітин/тканин: активність макрофагів, співвідношення елементів периферичної крові та інші [31].

Деякі біологічні ефекти дії пестицидів можна виявити досить рано на клітинному рівні, при цьому вони можуть одночасно слугувати в якості індикаторів експозиції. Враховуючи цей факт, цитогенетичні маркери пошкодження ДНК у циркулюючих лімфоцитах (хромосомні аберації, сестринські хроматидні обміни, мікроядра) і дані комет-тесту також можуть бути використані для визначення ранніх біологічних ефектів та в якості біомаркерів експозиції в осіб, що піддалися дії пестицидів. Але,

оскільки в більшості випадків, популяція людей постійно підпадає під дію комплексу ксенобіотиків, важко віднести генотоксичне ушкодження до якогось конкретного хімічного класу або сполуки [10, 19, 42].

Біомаркери ефекту використовуються у повсякденній практиці в цілях клінічної діагностики, допомагають визначити стадію та ступінь захворювання, призначити адекватну терапію, оцінити її ефективність.

Важлива роль у токсичності багатьох ФОС належить також опосередкованим ефектам, оскільки за дії ФОС у патологічний процес можуть залучатися практично всі фізіологічні системи і органи. До нехолінергічних механізмів дії ФОС належить здатність змінювати картину периферичної крові, функціональну активність імунної, монооксигеназної, антиоксидантної систем, а також впливати на печінку та нирки. Нехолінергічні механізми проявляються, головним чином, при повторному надходженні до організму невеликих доз ФОС, які нездатні викликати виражені холінергічні реакції та за дії менш токсичних речовин [2, 25].

Серед нехолінергічних показників інтоксикації ФОС найбільш відомими є:

- маркери ураження печінки та нирок – АСТ, АЛТ, ГГТ, ЛДГ, креатинін, сечовина сироватки крові;
- рівень неорганічного фосфору (підвищений у випадку хронічної інтоксикації ФОС);
- показники окислювального стресу – рівень малонового діальдегіду і загальний оксидантний статус (TOS) [19, 20].

Відомо, що імунна система є мішенню токсичної дії ФОС [2, 3, 5, 12, 15, 23, 43, 44]. Ефектами дії ФОС на імунну систему є: алергенний ефект (більшість ФОС є алергенами слабкої або середньої сили); пригнічення антитілогенезу та підвищення сприйнятливості до інфекції; пригнічення неспецифічної реактивності організму; пригнічення функціональної активності імунокомпетентних клітин (імунодефіцит по Т-типу); аутоімунні порушення (показано, що аутоантитіла виробляються до тканин тих органів, які найбільше зазнають токсичної дії речовин – печінки, нирок, мозку) [2, 3, 12, 23, 44].

Серед механізмів імунодепресивної дії ФОС виділяють прямий шлях – інгібуван-

ня серинових гідролаз або естераз у структурних елементах імунної системи (система комплементу, мембрана лімфоцитів), оксидативне пошкодження імунних органів або модуляція шляхів передачі сигналу, що контролює проліферацію і диференціацію лімфоцитів та їх ефекторну функцію. Непряму дію на імунну систему пов'язують із зміним холінергічним тонусом лімфоїдних органів, підвищенням продукції кортикостероїдів, зміною метаболізму за хронічної інтоксикації [2, 3, 12].

Незважаючи на наявність достатньої кількості наукових робіт з вивчення імунотоксичних ефектів ФОС, існують нез'ясовані питання та суперечливі дані, не визначені остаточно механізми дії ФОС на рівні органів та систем, не визначені біомаркери імунотоксичного ефекту фосфорорганічних пестицидів, що обґрунтовує необхідність подальших наукових досліджень впливу ФОС на імунну систему [2, 3, 12].

Стан імунореактивності за дії ФОС, що володіють ВНД та імунологічні біомаркери ефекту (за результатами власних досліджень). У ДП «Науковий токсикологічний центр імені академіка Л.І.Медведя МОЗ України» на класичній моделі ВНД ФОС (кури породи Leggorn) досліджено імунну реактивність організму при одноразовому пероральному введенні речовин в ізотоксичних дозах (за активністю холінестерази): ТОКФ у дозі 500 мг/кг і афос у дозі 200

мг/кг, які володіють вираженою ВНД, циклофос (O,S-dimethyl-O-cyclohexylthiophosphate) в дозі 10 мг/кг (не є інгібітором NTE та не викликає ВНД) [45, 46].

Встановлено, що за дії ТОКФ і афосу відбуваються однотипові зміни морфологічного складу периферичної крові курей, більш виражені в паралітичному періоді (21-а доба): вірогідне зниження абсолютної (на 22 і 27 % відповідно) та відносної кількості лейкоцитів (на 22 і 37 % відповідно), зниження абсолютної кількості лімфоцитів (на 39 і 62 % відповідно). Упродовж всього експерименту знижувалася метаболічна активність нейтрофілів, найбільше за дії афосу (на 28-55 %), ніж ТОКФ. Функціональна активність нейтрофілів за дії ТОКФ і афосу на 14-у і 21-у добу компенсувалася збільшенням їхньої кількості у крові (збільшення відносної кількості на 54 і 75 % відповідно) [45, 46].

Кількісні зміни імунокомпетентних клітин відбувались вже у допаралітичний період (7-а доба), наростаючи в паралітичний період (21-а доба): вірогідне зниження абсолютної кількості Т-лімфоцитів, В-лімфоцитів, НК-клітин, Тс (рис. 4) [46]. Збільшення коефіцієнта співвідношення Тх до Тс ($T_x/T_c=3,4-4,4$) вказує на аутоімунні порушення в організмі [46].

Як видно із рис.5, за впливу афосу у допаралітичний період (7-а доба) виявлено зниження функціональної активності

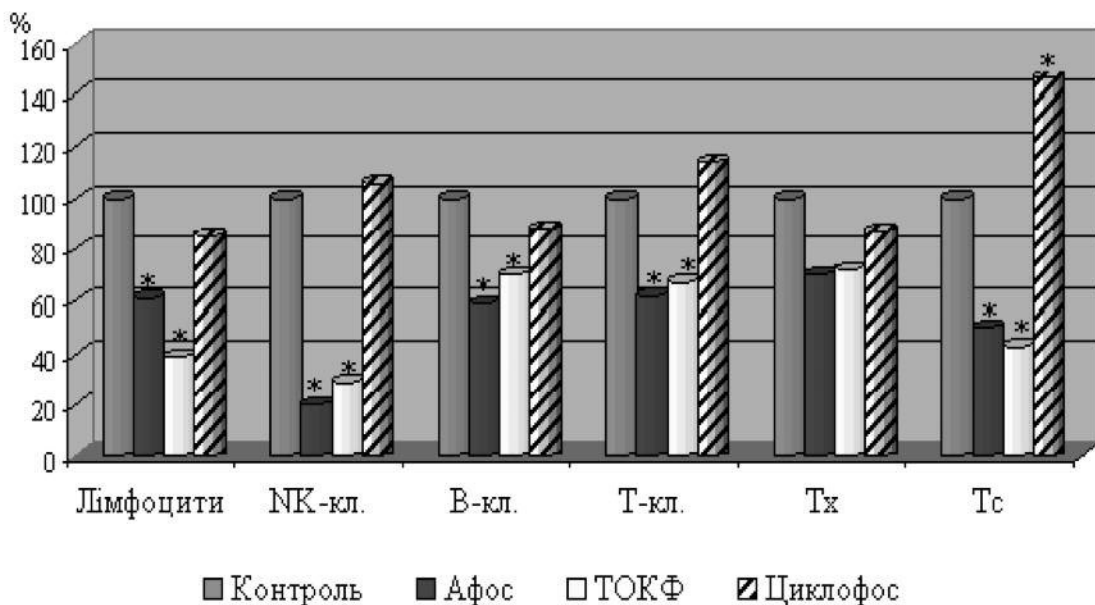


Рис. 4. Зміни абсолютної кількості імунокомпетентних клітин (%) курей у стадії паралічу за дії афосу, ТОКФ і циклофосу в ізотоксичних дозах (* – $p < 0,05$) [46].

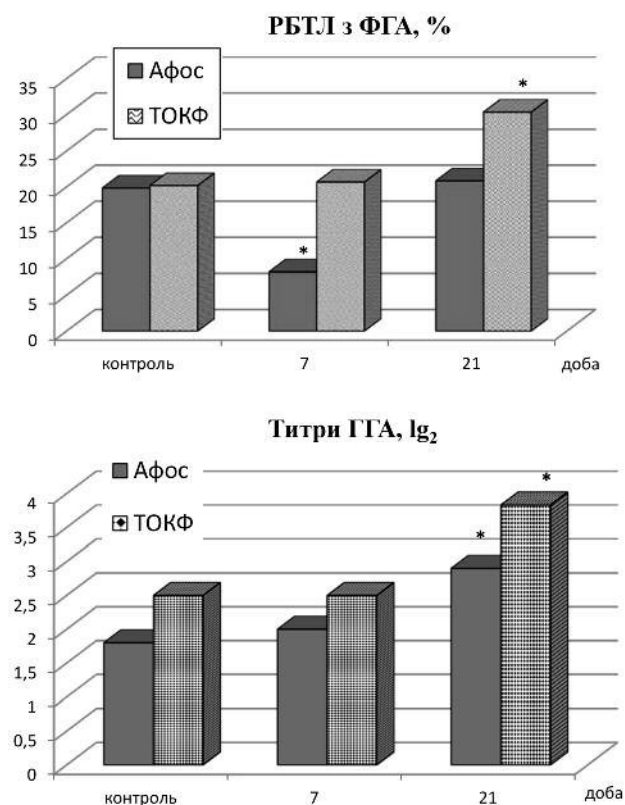


Рис.5. Функціональна активність Т- і В-лімфоцитів курей за гострого впливу афосу у дозі 200 мг/кг і ТОКФ у дозі 500 мг/кг (* – $P < 0,05$).

Т-лімфоцитів, про що свідчить зменшення на 59,0 % кількості бласттрансформованих лімфоцитів периферичної крові курей, в паралітичний період функціональна активність Т-лімфоцитів була на рівні контролю. На відміну від афосу, ТОКФ підвищував функціональну активність Т-лімфоцитів на 21-у добу, в порівнянні з контролем, на 50,4 %. За впливу як афосу, так і ТОКФ, функціональна активність В-лімфоцитів збільшувалась, про що свідчить підвищення на 21-у добу титрів ГГА в сироватці крові курей на 61,0 % і 53,0 % відповідно.

За дії як афосу, так і ТОКФ, у тварин з вираженими проявами нейропаралітичної дії спостерігалось значне зниження загального рівня ЦІК у сироватці крові, при цьому відбувалось накопичення дрібнодисперсних патогенних ЦІК, про що свідчать коефіцієнти співвідношення мілкодисперсних до крупнодисперсних ЦІК [47]. Найбільший рівень патогенних ЦІК спостерігався в паралітичний період (21-а

доба) і був виражений найбільше за впливу афосу (рис. 6).

Починаючи з 7-ї доби спостерігалось збільшення титрів аутоантитіл до тканинних антигенів головного мозку курей з клінікою ВНД. За впливу афосу (рис. 6) рівень титрів аутоантитіл в 3,2–4,3 раза був вищим за контроль. Рівень титрів аутоантитіл за впливу ТОКФ, у порівнянні з афосом, збільшувався менше і відрізнявся від контролю у 1,48 – 3,0 раза [47].

На відміну від афосу і ТОКФ, циклофос (в ізотоксичній дозі, 10 мг/кг) тільки на 7-у добу викликав відносний і абсолютний нейтрофіліоз, незначну відносну лімфоцитопенію, знижував відносну і абсолютну кількість В-лімфоцитів, збільшував відносну кількість Т-лімфоцитів. Виявлені зміни були нестійкими, і на 21-у добу кількісний склад імунокомпетентних клітин був на рівні контролю (рис. 4), за винятком збільшення абсолютної кількості Тс. Коефіцієнт Тх/Тс становив 1,43, що свідчить про його імунотоксичну дію. Циклофос призводив до транзиторного

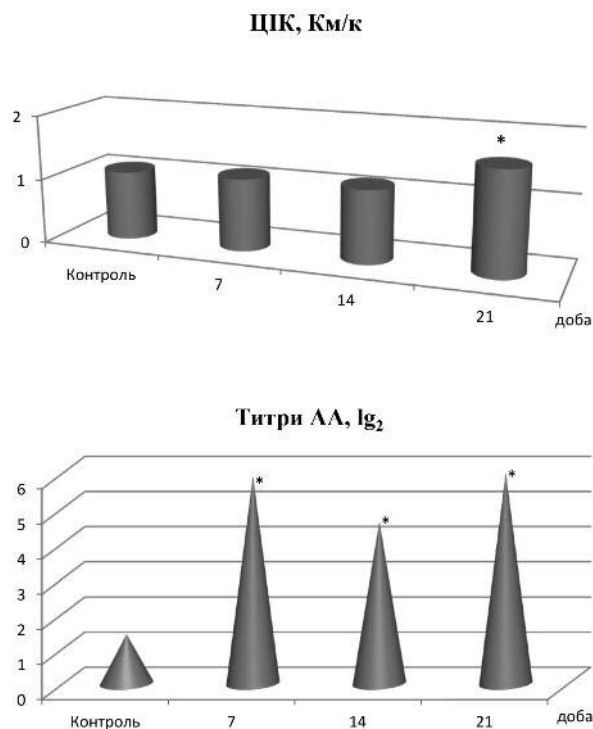


Рис. 6. Титри аутоантитіл (АА) до антигену із головного мозку курей і співвідношення мілкодисперсних до крупнодисперсних циркулюючих імунних комплексів (ЦІК, Км/к) за гострого впливу афосу в дозі 200 мг/кг (* – $P < 0,05$).

зниження функціональної активності нейтрофілів на 7-у добу, на 21-у добу цей показник не відрізнявся від контролю. За дії циклофосу збільшення рівня ЦІК у сироватці крові відбувалось переважно за рахунок великодисперсних форм, які легко виводяться з організму за допомогою фагоцитозу. Оскільки на 21-у добу відбувалось відновлення функціональної активності нейтрофілів і зниження рівня ЦІК, то цей факт свідчить про те, що вони виводяться із організму і не чинять пошкоджуючої дії на тканини [46, 47].

З наведених даних витікає, що за впливу афосу і ТОКФ в організмі курей в допаралітичний період формуються патогенні дрібнодисперсні ЦІК, рівень яких значно зростає в паралітичний період, знижується функціональна активність нейтрофілів. З розвитком патологічного процесу поглиблюються зміни імунної системи — знижується загальна кількість лімфоцитів, Т- і В-лімфоцитів, Тс, НК-клітин і збільшується рівень аутоантитіл до антигену з нервової тканини, що свідчить про розвиток аутоімунних порушень. Виявлений взаємозв'язок між вираженістю ознак ВНД ФОС і аутоімунними порушеннями в організмі курей, свідчить про важливу роль імунної системи в патогенезі даної патології.

Підтвердженням тому слугують дані щодо профілактики ускладнень, викликаних афосом. Показано, що проведення гемокарбоперфузії на 10-й день після отруєння афосом у дозі 200 мг/кг призводить до видалення дрібнодисперсних (патогенних) ЦІК, нормалізації метаболічної активності нейтрофілів і функціональної активності Т- і В-лімфоцитів, зменшення числа Тх [48]. Позитивний ефект гемокарбоперфузії узгоджується з клінічними ознаками ВНД: у всіх тварин, яким проводили гемокарбоперфузію, клінічні ознаки інтоксикації розвивались пізніше, були менш виражені, паралічі не розвивались. Цей факт свідчить, що імунна система відіграє значну роль у формуванні ВНД ФОС, а показники стану імунної системи можуть бути використані в якості біомаркерів ефекту.

Виходячи із ступеня змін імунологічних показників та їхнього взаємозв'язку із вираженістю клінічних проявів ВНД ФОС, в якості біомаркерів тяжкості перебігу,

ефективності лікування та прогнозу ускладнень нами запропоновано використання наступних показників: рівень дрібнодисперсних ЦІК у сироватці крові та рівень аутоантитіл до тканин головного мозку; кількість та функціональна активність нейтрофілів крові; кількість Т- і В-лімфоцитів та їх функціональна активність; кількість НК-клітин, Тх і Тс.

Таким чином, незважаючи на наявність достатньої кількості наукових даних щодо біомаркерів дії ФОС, існують деякі проблеми, пов'язані з діагностикою отруєнь ФОС, особливо у випадках підгострих та хронічних інтоксикацій. Біомаркери, які найбільше використовуються, а саме АСhЕ та ВСhЕ є специфічними лише в ранні терміни інтоксикації, ступінь інгібування холінестераз не завжди корелює зі ступенем інтоксикації, що знижує діагностичну цінність цих традиційних біомаркерів. Визначення естеразного статусу організму є більш ефективним та інформативним біомаркером експозиції ФОС, але при цьому не враховуються важливі біомаркери, що не пов'язані з їхньою антихолінестеразною дією [20]. Поряд з визначенням активності естераз важливе значення в діагностиці, оцінці перебігу і прогнозуванні ускладнень дії ФОС мають інші біомаркери ефекту, що відображають стан різних систем, які беруть участь у підтриманні гомеостазу організму.

Отже, на підставі аналізу даних сучасної літератури та результатів власних досліджень, узагальненням проведеної роботи є **ВИСНОВКИ:**

1. Для оцінки ризику для здоров'я ФОС, скринінгу на індивідуальному і популяційному рівнях та з метою клінічної діагностики доцільно використовувати біомаркери експозиції та ефекту: активні речовини або їх метаболіти, аддукти з білками, «естеразний статус» організму та інші біомаркери, не пов'язані з їхньою специфічною дією.

2. В якості імунологічних біомаркерів, що дозволяють оцінити важкість перебігу, ефективність лікування та прогнозувати ускладнення за дії ФОС, що володіють ВНД, можуть бути використані наступні показники: рівень дрібнодисперсних ЦІК у сироватці крові та рівень аутоантитіл до тканин головного мозку; кількість та

функціональна активність нейтрофілів крові; кількість Т- і В-лімфоцитів та їх функціональна активність; кількість НК-клітин, Тх і Тс.

3. Існує необхідність створення та обґрунтування уніфікованого діагностичного комплексу, який включатиме біомар-

кери експозиції, специфічної та неспецифічної дії, матиме значно більші діагностичні можливості у порівнянні з визначенням окремих показників та стане основою для встановлення діагнозу, оцінки ефективності лікування та прогнозування наслідків отруєнь ФОС.

ЛІТЕРАТУРА

1. Лужников Е.А. Острые отравления: Руководство для врачей. 2-е изд., перераб. и доп. / Е.А. Лужников, Л.Г., Костомарова. – М.: Медицина. – 2000. – 434 с.
2. Жминько П.Г. Иммунная система как мишень токсического воздействия химических веществ / П.Г. Жминько // Актуальные проблемы транспортной медицины. – № 1 (23). – 2011. – С.17–30.
3. Забродский П.Ф. Иммунотоксикология фосфорорганических соединений / П.Ф. Забродский. – Саратов. Издательство «Саратовский источник». – 2016. – 289 с.
4. Тосиканти антихолінестеразної дії: механізм дії, клінічні ознаки та актуальні питання забезпечення засобами антидотної терапії / Л.А. Устінова, Н.М. Серединська, Н.В. Курдиль [та ін.] // Сучасні проблеми токсикології, харчової та хімічної безпеки. – 2017. – №3(79) – С.73–82.
5. Díaz-Resendiz K. J. G. Modulation of Immune Response by Organophosphorus Pesticides: Fishes as a Potential Model in Immunotoxicology / K. J. G. Díaz-Resendiz, G. A. Toledo-Ibarra, M. I. Girón-Pérez // Hindawi Publishing Corporation. Journal of Immunology Research. – V. 2015. – 10 p.
6. Pore N. E. Organophosphorus poisoning / N. E. Pore, K. N. Pujari, S. P. Jadkar // International Journal of Pharma and Bio Sciences. – Vol.2. – Issue 4. – 2011. – P. 604–612.
7. Биомаркеры и оценка риска: концепции и принципы (Гигиенические критерии состояния окружающей среды; 155) / Совместное издание Программы ООН по окружающей среде, Международной организации труда и Всемирной организации здравоохранения. – Всемирная организация здравоохранения, Женева. – 1996. – 96 с.
8. Петров А.Н. Антидоты фосфорорганических отравляющих веществ / А.Н. Петров, Г.А. Софронов, С.П. Нечипоренко, И.Н. Сомин // Рос. Хим. Журнал. – 2004. – т. XLVIII. – № 2. – С. 110–116.
9. Харченко О.А. Острые отравления фосфорорганическими соединениями: основные клинические синдромы и механизмы их формирования обзор литературы и данные собственных исследований / О.А. Харченко, Г.М. Балан, Н.Н. Бубало // Сучасні проблеми токсикології. – 2013. – №1-2. – С.17–31.
10. Biomonitoring and biomarkers of organophosphate pesticides exposure – state of the art / L. Kapka-Skrzypczak, M. Syranka, M. Skrzypczak, M. Kruszewski // Annals of Agricultural and Environmental Medicine. – 2011. – Vol. 18. – No 2. – P. 294–303.
11. Курдиль Н.В. Особенности острых отравлений пестицидами в условиях города: карбаматы, пиретроиды, неоникотиноиды / Н.В. Курдиль, О.В. Иващенко, В.Ф. Струк, А.Г. Богомол // Медицина неотложных состояний. – 2015. – №7 (70). – С.43–49.
12. Galloway T. Immunotoxicity of Organophosphorous Pesticides / T. Galloway, R. Handy // Ecotoxicology. – 2003. – № 12. – P. 345–363.
13. Eleršek T. Organophosphorus Pesticides – Mechanisms Of Their Toxicity / T. Eleršek, M. Filipič // Pesticides – The Impacts of Pesticides Exposure [edited by Prof. M. Stoytcheva]. – 2011. – P.243–260.
14. Associations between dietary factors and urinary concentrations of organophosphate and pyrethroid metabolites in a Canadian general population / Ye Ming, J. Beacha, J. W. Martin, A. Senthilselvan // Int. J. Hyg. Environ. Health. – 2015. [Електронний ресурс].– Режим доступу : <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijheh.2015.06.006>.
15. Repetto R. Pesticides and the Immune System: The Public Health Risks / R. Repetto, Sanjay S. Baliga // World Resources Institute. – 1996. – 103 p.
16. Esterase Status of Various Species in Assessment of Exposure to Organophosphorus Compounds / Natalia P. Boltneva, Elena V. Rudakova, Larisa V. Sigolaeva, Galina F. Makhaeva // Toxicological Problems [editor: Christophor Dishovsky and Julia Radenkova-Saeva]. – Bulgarian Toxicological Society. Military Publishing House. – Sofia, Bulgaria. – 2014. – P.27–38.
17. Biomarkers and Risk Assessment: Concepts and Principles / World Health Organization, Geneva. – 1993. – 87 p.
18. Biomonitoring of Exposure in Farmworker Studies / Dana B. Barr, K. Thomas, B. Curwin [et al.] // Environmental Health Perspectives. – June 2006. – Volume 114. – № 6. – P. 936-942.
19. Araoud M. Biological Markers of Human Exposure to Pesticides / M. Araoud // Pesticides in the Modern World. Pests Control and Pesticides. Exposure and Toxicity Assessment [Edited by Dr. Margarita Stoytcheva].– 2011. – 614 p.
20. Войтенко Н.Г. Проблемы диагностики при интоксикации фосфорорганическими соединениями / Н.Г. Войтенко, Д.С. Прокофьева, Н.В. Гончаров // Токсикологический вестник. – 2012. – №5(122).– С.2–6.
21. Лабораторные методы исследования в клинике / В.В. Меньшиков, Л.Н. Делекторская, Р.П. Золотницкая [и др.]. – Справочник [под ред. В.В. Меньшикова]. – М.: Медицина. – 1987. – 368 с.
22. Биохимические, иммунологические и биофизические методы в токсикологическом эксперименте / Методическое руководство под ред. У.А. Кузьминской. – К.: Ротапринт. – 1989. – С. 59-61.
23. Забродский П.Ф. Патогенетические механизмы нарушений иммунного статуса фосфорорганическими соединениями в сочетании с антидотами и их коррекция / П.Ф. Забродский, И.Х. Яфарова. – Саратов. – 2009. – 185 с.
24. Каган Ю.С. Блокаторы холинэстеразы / Ю.С. Каган, Н.В. Кокшарева, П.Г. Жминько // Общая токсикология [под ред. Б.А. Курляндского, В.А. Филова]. – М.: Медицина. – 2002. – 608 с.

25. Куценко С.А. Основы токсикологии: Научно-методическое издание / С.А. Куценко. – СПб., ООО Изд. «Фолиант». – 2004. – 720 с.
26. Rosenberg Y.J. A pretreatment or post exposure treatment for exposure to a toxic substance by pulmonary delivery (inhaler) of a bioscavenger / Y.J. Rosenberg // PCT Int. Appl. (WO 2005000195 A2). – 2005. – V.6. – № 1. – 22 p.
27. Organophosphate Pesticides & Child Health: A Primer for Health Care Providers [Электронный ресурс] / 2007 Pediatric Environmental Health Specialty Unit (PEHSU), Department of Environmental & Occupational Health Sciences. – Режим доступа: http://depts.washington.edu/opchild/pdf/3_Acute_Poisoning.pdf.
28. Биосенсоры для анализа активности нейротоксической эстеразы как биомаркера токсического действия нейротоксических фосфорорганических соединений / Л.В. Сиголаева, И.Н. Курочкин, А.В. Еременко [и др.] // Рос. Хим. Журнал. – 2004. – Т. XLVIII. – №4. – С. 65–72.
29. Biomarkers of organophosphorus (OP) exposure in humans / J. Marsillach, R.J. Richter, J.H. Kim [et al.] // Neurotoxicology. – 2011 Oct. – 32(5). – P. 656–660.
30. Biomarker and surrogate endpoints: preferred definition and conceptual framework / A.J. Atkinson, W.A. Colburn, V.G. De Gruttola [et al.] // Clin. Pharmacol. Ther. – 2001 (69). – P. 89–95.
31. Онищенко Г.Г. Гигиеническая индикация последствий для здоровья при внешнесредовой экспозиции химических факторов / Г.Г. Онищенко, Н.В. Зайцева, М.А. Землянова [под ред. Г.Г. Онищенко]. – Пермь, 2011. – 532 с.
32. Biological markers in environmental health research / NRC (National Research Council). – Environ. Health Perspect. – 1987. – V.74. – P. 3–9.
33. Dietert R.R. Biomarkers for the 21st Century: Listening to the Microbiome / R.R. Dietert, E.K. Silbergeld // Toxicological Sciences. – 2015. – V.144(2). – P. 208–216.
34. Esquivel-Senties M. S. Organophosphorous Pesticides Metabolite Reduces Human T CD8 Homeostasis and Proliferation by Inducing Cellular Death / M. S Esquivel-Senties, L. Vega // J Environment Analytic Toxicol., S4:004. – 2012. [Электронный ресурс]. – Режим доступа <http://dx.doi.org/10.4172/2161-0525.S4-004>.
35. Определение метаболитов фосфорорганических отравляющих веществ в биомедицинских пробах с использованием твердофазной экстракции / И.А. Берзин, В.С. Романов, Е.И. Савельева [и др.] // Судебная медицина. – 2009. – Том 10. – С. 45–56.
36. Луйк А.И. Сывороточный альбумин и биотранспорт ядов / А.И. Луйк, В.Д. Лукьянчук // М.: Медицина. – 1984. – 224 с.
37. Жминько П.Г. Токсичність і антихолінестеразна дія деяких фосфорорганічних пестицидів в залежності від їх сорбції на протеїнах сироватки крові / П.Г. Жминько, Ю.І. Лобода // Современные проблемы токсикологии. – 2003. – №1. – С.18–21.
38. «Эстеразный статус» организма при воздействии токсических веществ и препаратов / И.Д. Курдюков, В.И. Шмурак, А.Д. Надеев [и др.] // Токсикологический вестник. – 2012. – №6(117). – С.6–13.
39. Makhaeva G. F. Investigation of Esterase Status as a Complex Biomarker of Exposure to organophosphorus Compounds / G.F. Makhaeva, E.V. Rudakova, L.V. Sigolaeva // Toxicological Problems [editor: Christophor Dishovsky and Julia Radenkova-Saeva]. – Bulgarian Toxicological Society. Military Publishing House. – Sofia, Bulgaria. – 2014. – P.15–26.
40. Семейство биосенсорных анализаторов для оценки «эстеразного статуса» организма / Л.Г. Соколовская, Л.В. Сиголаева, А.В. Еременко [и др.] // Химическая и биологическая безопасность. – 2004. – № 1–2 (13–14). – С.21–31.
41. Thompson C.M. Anticholinesterase insecticides / C.M. Thompson., R.J. Richardson // [edited by T.C. Marrs, V. Ballantyne]. – New York, Wiley. – 2004. – P. 89–127.
42. Biomarkers of chemical exposure: State of the art / P. Grandjean, S.S. Brown, P. Reavey, D.S. Young // Clin Chem. – 1994. – № 40(7). – P.1360–1362.
43. Effects of pesticide exposure on the human immune system / E. Corsini, J. Liesivuori, T. Vergieva [et al.] // Human & Experimental Toxicology. – 2008 (27). – P. 671–680.
44. Влияние фосфорорганических соединений на факторы врожденного иммунитета мышей / Т.С. Запорожец, Л.А. Иванушко, А.К. Гажа, [и др.] // Биомедицина. – 2013. – № 1. – С. 36–47.
45. Жминько П.Г. Видові особливості імунної реактивності організму при дії нейропаралітичних фосфорорганічних речовин / П.Г. Жминько, М.Г. Проданчук, М.В. Янкевич // Современные проблемы токсикологии. – 2002. – №1. – С. 46–51.
46. Жминько П.Г. Роль імунної системи і неспецифічної реактивності організму в патогенезі отруєнь фосфорорганічними пестицидами і синтетичними регуляторами росту рослин: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня доктора біол. наук: спец. 14.03.06 «Токсикологія» / Жминько Петро Григорович; «Інститут фармакології та токсикології НАМН України». – Київ, 2005. – 39 с.
47. Жминько П.Г. Роль иммунной системы в патогенезе отдаленной нейротоксичности некоторых фосфорорганических соединений / П.Г. Жминько // Современные проблемы токсикологии. – 1999. – №4. – С. 18–24.
48. Zhminko P.G. Delayed Neurotoxicity Induced by Organophosphates: Experimental Correction of Neuropathy / P.G. Zhminko. N.V.Kokshareva // Toxicological Problems [edited by major-general prof. Stoian Tonev, prof. Kamen Kanev, prof. Christophor Dishovsky, assoc. prof. Eugenia Stankova]. – Sofia, Bulgaria, Publishing Hous Irita. – 2011. – P.175–183.

БИОМАРКЕРЫ ЭКСПОЗИЦИИ И ЭФФЕКТА ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

(обзор данных литературы и результаты собственных исследований)

Е.В. Федченко, П. Г. Жминько

*"Научный центр превентивной токсикологии, пищевой и химической безопасности
имени академика Л.И.Медведева Министерства здравоохранения Украины", г. Киев, Украина*

РЕЗЮМЕ. *Цель исследования:* анализ и обобщение данных литературы и собственных исследований относительно возможностей использования биомаркеров экспозиции и эффекта фосфорорганических соединений (ФОС), определение иммунологических биомаркеров эффекта при воздействии ФОС, вызывающих отдаленное нейротоксическое действие (ОНД).

Матеріали і методи. В роботі використані аналітичні методи: збір научної інформації по проблемі, аналіз даних і научне обобщення результатів. Проведена переоцінка впливу ФОС, викликаючих ОНД, з позиції визначення найбільш інформативних імунологічних біомаркерів ефекта відомих нейротоксикантів. Проаналізовані результати дослідження впливу на імунну систему нейротоксичних ФОС, ТОКФ і афоса виконані на найбільш чутливої моделі – курах породи Leghorn в ізотоксичних дозах (500 мг/кг і 200 мг/кг відповідно) з використанням общепринятих методів імунотоксикології.

Результати дослідження. В статті проаналізовані і обобщені дані сучасної літератури стосовно обґрунтованого використання біомаркерів експозиції і ефекта ФОС, які широко розповсюджені в об'єктах навколишнього середовища і є однією з причин гострих і хронічних отравлень серед населення. Розглянуті проблеми необхідності впровадження науково-обґрунтованого підходу до розробки і оцінки біомаркерів, а також створення уніфікованого діагностичного комплексу, що включає біомаркери експозиції, специфічного і неспецифічного дії, який буде основою діагностики, ефективного лікування і прогнозування наслідків отравлень ФОС. На основі результатів власних досліджень запропоновано застосування деяких показників як імунологічних біомаркерів ефекта ФОС, що викликає ОНД: рівень мелкодисперсних циркулюючих імунних комплексів в сироватці крові і рівень аутоантитіл до тканин головного мозку; кількість і функціональна активність нейтрофілів крові; кількість Т- і В-лімфоцитів і їх функціональна активність; кількість НК-кліток, Т-хелперів і Т-супресорів.

Ключові слова: фосфорорганічні сполуки, експозиція, віддалене нейротоксичне діє, діагностика, біомаркери.

BIOMARKERS OF EXPOSURE AND EFFECT OF ORGANOPHOSPHORUS COMPOUNDS
(literature review and results of own studies)

O. Fedchenko, P. Zhminko

State Enterprise "L. I. Medved's Research Center of Preventive Toxicology,
Food and Chemical Safety of the Ministry of Health of Ukraine", Kyiv, Ukraine

ABSTRACT. Objective: analysis and summary of the literature data and own studies on the possibility of using biomarkers of exposure and effect of organophosphorus compounds (OPCs), determination of immunological biomarkers of the effect under exposure to OPCs that cause delayed neurotoxicity (DN).

Materials and Methods. Analytical methods were used in the work: collection of scientific information on the topic, analysis of data and scientific summary of the results. Re-assessment of the effect of OPCs causing DN was performed from the perspective of determination of the most informative immunological biomarkers of the effect of known neurotoxicants. Analysis of the study results of the effect of neurotoxic OPCs, triorthocresyl phosphate (TOCP), Afos on the immune system was performed using the most sensitive model – chicken breed Leghorn in isotoxic doses (500 mg/kg and 200 mg/kg, respectively) using common immunotoxicology methods.

Results and Conclusions. The article analyses and concludes current literary data on the justified use of biomarkers of exposure and effect of OPCs that are widespread in the environmental objects and are one of the reasons of acute and chronic poisoning in the population. We've reviewed aspects of the necessity for implementation of scientifically justified approach to the development and assessment of biomarkers and creation of the unified diagnostic complex that includes biomarkers of exposure, specific and non-specific action, with wider diagnostic abilities compared with determination of isolated parameters that is the basis for diagnostics, efficient treatment and prediction of consequences of poisoning with OPCs. Based on the results of own studies, we proposed the use of some parameters as the immunological biomarkers of the effect of OPCs with DN: the level of finely dispersed circulating immune complexes in the blood serum and the level of anti-brain antibodies, the number and functional activity of blood neutrophils; the number of T- and B-lymphocytes and their functional activity; the number of NK-cells, T-helper cells, and T-suppressors.

Key words: organophosphorus compounds, exposure, delayed neurotoxicity, diagnostics, biomarkers.

Надійшла до редакції 23.11.2018 р.