

УДК 579.695

Латыпова Эльвира Азатовна

доцент,
кафедра биологии, биологических технологий
и ветеринарно-санитарной экспертизы
elviralat@gmail.com

Шишкина Татьяна Виктровна

кандидат сельскохозяйственных наук, доцент
кафедра производства продукции животноводства
Пензенский государственный аграрный университет
shishkina.t.v@pgau.ru

Камбурова Венера Сейтумеровна

кандидат биологических наук, заведующая лабораторией
Центр геномики и биоинформатики Академии наук
Республики Узбекистан
venera_k75@mail.ru

Elvira A. Latypova

Associate professor
Department of Biology, Biological Technology and
Veterinary and sanitary expertise
elviralat@gmail.com

Tatiana V. Shishkina

Candidate of Agricultural Sciences, associate
Professor Department of Livestock Production
Penza State Agrarian University
shishkina.t.v@pgau.ru

Venera S. Kamburova

PhD in biology
Head of Laboratory
Center of genomics and bioinformatics of the Academy of Sciences of Uzbekistan
venera_k75@mail.ru

**Анализ воздействия экотоксикантов окружающей среды
на ферменты и гены системы метаболизма
ксенобиотиков млекопитающих**

**Analysis of the impact of environmental ecotoxicants on enzymes and genes of
the mammalian xenobiotic metabolism system**

Аннотация. Изучено влияние пестицида циперметрина на ферменты и гены системы метаболизма ксенобиотиков (СМК) клеток печени млекопитающих. Результаты исследований показали, что содержание ферментов детоксикационной системы – P-450 и B-5 при хроническом введении циперметрина в дозе 1/30 LD₅₀ в течении 2-х недель снижается на 29% для цитохрома

P-450 и на 21% - для цитохрома B-5. Изучение функции детоксикационных генов CYP 1A1 и 2E1, кодирующих аналогичные изоферменты из семейства генов цитохрома P-450 показало подавление их активности: активность двух гидроксилаз 1A1 и 2E1 при хроническом введении пестицида подавляется на 34 и 23% соответственно.

Ключевые слова: пестициды, циперметрин, система метаболизма ксенобиотиков (СМК), цитохром P-450, цитохром B-5, гены детоксикации, ген CYP 1A1, ген CYP2E1.

Annotation. *The effect of the pesticide cypermethrin on the enzymes and genes of the xenobiotic metabolism system (XMS) of mammalian liver cells was studied. The research results showed that the content of enzymes of the detoxification system - P-450 and B-5 with chronic administration of cypermethrin at a dose of 1/30 LD50 within 2 weeks decreases by 29% for cytochrome P-450 and by 21% for cytochrome B -five. The study of the function of the detoxification genes CYP 1A1 and 2E1, encoding similar isozymes from the family of cytochrome P-450 genes, showed suppression of their activity: the activity of two hydroxylases 1A1 and 2E1 during chronic administration of the pesticide is suppressed by 34 and 23%, respectively.*

Key words: pesticides, cypermethrin, xenobiotic metabolism system (XMS), cytochrome P-450, cytochrome B-5, detoxification genes, CYP 1A1 gene, CYP 2E1 gene.

Актуальность. Техногенное загрязнение окружающей среды продуктами химизации сельского хозяйства приводит к неуклонному изменению химического состава среды обитания живых существ. Экологические последствия загрязнения окружающей среды проявляются в нарушении состоянии здоровья населения.

В государственном каталоге пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации на начало 2020 года зарегистрировано 652 единицы разрешенных к применению препаративных форм пестицидов (отдельных и смешанных по действующему веществу)[3].

Проблема оценки степени опасности пестицидов является одной из ключевых проблем при проведении предупредительного и текущего санитарного надзора, при внедрении и дальнейшем применении новых препаратов[2].

Наилучший прогноз токсической опасности по отношению к человеку может быть сделан на основании комплексных исследований на млекопитающих лабораторных животных, включающих изучение генотоксичности веществ окружающей среды.

В основе токсического действия химических веществ на живые системы лежит их способность нарушать фундаментальные системы в клетке, составляющие основу жизнедеятельности организма: синтез белка, дыхание, окислительное фосфорилирование, метаболизм ксенобиотиков. Эти фундаментальные процессы связаны с определенными внутриклеточными структурами. Применительно к действию химических веществ можно выделить структурно-метаболический комплекс эндоплазматического ретикулула, в котором расположены ферменты микросомальной системы метаболизма ксенобиотиков (СМК), ответственные за биотрансформацию чужеродных химических веществ.

Ключевыми ферментами этой системы являются цитохромы Р-450 и В-5 и их множественные формы[4].

Белок цитохрома Р-450 синтезируется на рибосомах шероховатых мембран эндоплазматического ретикулума. От количества, качества и активности ферментов этой системы зависит её функция и способность детоксифицировать поступающие в организм токсические вещества, в частности, пестициды. Биотрансформация ксенобиотиков с помощью СМК служит живой фазой детоксикации, обеспечивающей поддержание гомеостаза организма при действии химических веществ.

Циперметрин - основной действующий компонент целого ряда инсектицидных препаратов, широко применяемых в борьбе с вредителями сельскохозяйственных растений[1].

Цель исследования: изучение влияния пестицида циперметрина на ферменты и гены СМК клеток печени млекопитающих.

Материал и методы. Объектом исследования служили лабораторные крысы линии Вистар весом 100- 150 г. Животные были подразделены на группы: контроль и опыт. Опытным животным циперметрин вводили в дозе 1/30 LD₅₀ в течение двух недель через день перорально в виде водной суспензии. Контрольным животным вводили внутривенно физиологический раствор.

Содержание цитохромов определяли при помощи дифференциального двухлучевого спектрофотометра Perkin- Elmer(Англия) по методу Omura, Sato[7].

Определение функциональной активности генов детоксикации 1A1 и 2E1 в реакциях гидроксирования специфических субстратов проводили по методу Коор [6].

Результаты исследования.

Печень является основным органом метаболизма ксенобиотиков [5].

Масса ее составляет 2% от массы человека и 4% - от массы тела животных. В ней метаболизируется примерно две трети от общего количества экзогенных веществ, поступающих в организм. На 1 г печени человека приходится 10 нмоль цитохрома Р-450, а на 1 г печени крыс - 30 нмоль этого фермента.

Нами изучено содержание ферментов СМК - цитохромов Р-450 и В-5, в микросомах печени крыс в экспериментах с длительным введением пестицида циперметрина.

Как установлено (табл. 1), при хроническом 2-недельном введении пестицида содержание цитохромов снижается на 29% для цитохрома Р-450 и на 21% - для цитохрома В-5 по сравнению с контролем, т.е. при воздействии пестицида происходит подавление биосинтеза ферментов СМК в микросомах печени. Таким образом, как показывают наши результаты, при хроническом введении циперметрина функциональная активность детоксикационной функции печени подавляется, что видно из данных снижения содержания основных ферментов биотрансформации ксенобиотиков, которые лимитируют скорость процессов, ответственных за обеззараживание вредных химических веществ, поступающих извне.

Таблица 1

Уровень ключевых ферментов детоксикационной системы печени крыс при хроническом действии циперметрина.

Вариант	Цитохром P - 450, нмоль/мг белка м/с	Цитохром В-5, нмоль/мг белка м/с
Контроль	0.75 ±0.02 (100%)	0.61 ±0.03 (100%)
Опыт (введение циперметрина)	0.53 ±0.01 (71%)	0.48 ± 0.01 (79%)

В настоящее время известно более 200 генов детоксикации, которые кодируют множественные формы цитохрома P-450, причем для многих из них выявлены полиморфизмы, существенно влияющие на функциональную активность их аллелей. С открытием множественных форм цитохрома P-450, участвующих в метаболизме одного или нескольких соединений, открывается возможность определять функциональную активность каждой из форм, особенно при введении специфических субстратов. Реакционная способность каждой изоформы зависит от уровня экспрессии гена определенного цитохрома P-450.

Для своих исследований мы выбрали 2 гена детоксикации CYP 1A1 и CYP 2E1. Ген CYP 1A1 кодирует изоформу цитохрома P-450 1A1, метаболизирующую опасные ксенобиотики - диоксины и другие полихлорированные углеводороды, известные своей повышенной токсичностью и канцерогенностью. Ген 2E1 кодирует изоформу цитохрома P-450 2E1, метаболизирующего многие низкомолекулярные вещества, среди которых имеются прямые канцерогены, как N-нитрозоамины.

Для определения функции изучаемых генов мы исследовали скорость реакции, катализируемой продуктами этих генов - цитохромы P-450 1A1 и 2E1 в реакциях гидроксилирования специфических для них субстратов: этоксирезорифина и паранитрофенола.

Гидроксилирование этоксирезорифина (ЭОР) и паранитрофенола (ПНФ) - одна из немногих цитохром P-450 катализируемых реакций, осуществляемых исключительно изоферментами 1A1 и 2E1. Активность гидроксилаз, регистрируемых в этих реакциях, относится исключительно за счет биосинтеза этих форм цитохрома P-450. Учитывая, что субстраты в реакцию добавляются в избытке, скорость гидроксилирования зависит только от содержания вновь экспрессированных форм цитохромов P-450 1A1 и 2E1. Это доказано иммунохимическими методами. Следовательно, по активности гидроксилирования ЭОР и ПНФ, осуществляемого соответствующими ферментами - цитохромами 1A1 и 2E1, мы можем судить о работе генов этих ферментов при хроническом введении пестицида - циперметрина.

Таблица 2

Активность генов детоксикации при хроническом действии циперметрина.

Вариант	Активность гидроксилаз, нмоль продукта мин/мл. белка
---------	---

	1A1	2E1
Контроль	0.38±0.02 (100%)	0.26 ±0.01 (100%)
Опыт (хроническое введение циперметрина)	0.25 ± 0.05 (66%)	0.20 ± 0.02 (77%)

Полученные результаты экспериментов показали (табл. 2), что активность двух гидроксилаз 1A1 и 2E1 при хроническом введении пестицида циперметрина подавляется на 34 и 23% соответственно. Следовательно, скорость гидроксиглирования субстратов зависит исключительно от количества гидроксиглирующих монооксигеназ (цитохромов P-450 1A1 и 2E1), которые являются продуктами синтеза соответствующих генов CYP 1A1 и CYP 2E1. Следовательно, по скорости реакции гидроксиглирования можно говорить об активности соответствующих генов, так как продукты их экспрессии определяют скорость данных реакций.

Таким образом, хроническое введение циперметрина подавляет активность генов CYP 1A1 и CYP 2E1 и снижает содержание продуктов экспрессии - цитохромов P-450 1A1 и 2E1.

Литература

1. Алешо Н.А. *Современные методы и средства уничтожения вредных насекомых и клещей – переносчиков возбудителей болезней человека: учебн. пособие / Н.А.Алешо, М.Н. Костина, А.Н.Каира; ГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования»: - М.: ГБОУ ДПО РМАПО, 2015.- 76 с.*
2. *Оценка мутагенной активности пестицидов: методические указания. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2016. –С. 8.*
3. *Страновой обзор производства и использования особо опасных пестицидов в России. –М., Россия:Эко-Согласие, 2020.–С.2.*
4. *Ракитский В Н., Турусов В.С. Мутагенная и канцерогенная активность химических соединений / В Н. Ракитский, В. С.Турусов //Вестник РАМН. - 2005.- №3. - С.7-9.*
5. *Рембовский Р.Процессы детоксикации при воздействии химических веществ на организм // Р. Рембовский, Л. А. Могиленкова – СПб.: Издательство Политехнического у-та, 2017. – С. 50.*
6. *Koop D. K. Hydroxylation of p- Nitrophenol by rabbit ethanol inducible cytochrom p-450 isoinsime 3. / D. Koop // Mol. Pharmacol. –1986. –V. 291. – P. 399-442.*
7. *Omur T, Sato R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes/T. Omur, R. J Sato //Biol. chem. –1964. – V.239. –P.2379-2385.*

Literature

1. *Alesho N.A. Modern methods and means for the destruction of harmful insects and ticks - carriers of pathogens of human diseases: tutorial / N.A. Alesho, M.N. Kostina, A.N. Cairo; SBEI APE "Russian Medical Academy of Postgraduate Education": - М.: SBEI APE RMAPE, 2015.- 76 p.*

2. *Assessment of mutagenic activity of pesticides: guidelines.* - M.: Federal Center for Hygiene and Epidemiology of Rospotrebnadzor, 2016. –P. 8.
3. *Country profile of the production and use of highly hazardous pesticides in Russia.* - M., Russia: Eco-Accord, 2020.- P. 2.
4. *Rakitskiy VN, Turusov VS Mutagenic and carcinogenic activity of chemical compounds / V. N. Rakitsky, V. S. Turusov // Bulletin of the Russian Academy of Medical Sciences.* - 2005.- No. 3. - P.7-9.
5. *Rembovsky R. Detoxification processes when exposed to chemicals on the body // R. Rembovsky, L. A. Mogilenkova - SPb.: Publishing house of the Polytechnic University, 2017. - P. 50.*
6. *Coop D. K. Hydroxylation of p-Nitrophenol by rabbit ethanol inducible cytochrom p-450 isoinsime 3. / D. Coop // Mol. Pharmacol.* - 1986. –V. 291. - P. 399-442.
7. *Omur T, Sato R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes / T. Omur, R. J Sato // Biol. chem.* –1964. - V.239. - P.2379-2385.