

УДК 57.044 : 615.9

АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНА ВСHE С АКТИВНОСТЬЮ БУТИРИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ КРЫС ПОСЛЕ ОТРАВЛЕНИЯ МАЛАТИОНОМ

А.В. Бабкин¹, И.С. Бердинских¹,
Н.С. Осечкина¹, Г.В. Назаров¹,
М.А. Юдин¹, В.Н. Быков¹, А.М. Сарана²

¹Научно-исследовательский испытательный институт военной медицины Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова, 195043, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация
²СПб ГБУЗ «Городская больница № 40», 197706, г. Сестрорецк, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

На модели отравления крыс малатионом в дозе 1 ЛД₅₀ исследована ассоциация полиморфизмов гена *Vсhe* с активностью бутирилхолинэстеразы. Изучено распределение генотипов 6 полиморфных вариантов гена *Vсhe*. Показана достоверная ($p < 0,05$) ассоциация вариантов Т>С (SNPID rs198598583), G>Т (SNPID rs106118718), А>Т (SNPID rs107226860) с активностью бутирилхолинэстеразы в ткани печени через 1 сутки после отравления, а их распространенность характеризуется сцепленным типом наследования. Наибольшая корреляционная связь активности фермента в печени прослежена для аллельных вариантов А>Т (rs107226860) и G>Т (rs106118718). У крыс с гомозиготным вариантом генотипа активность фермента была достоверно больше (на 30%) по сравнению с гетерозиготным генотипом.

Ключевые слова: генетический полиморфизм, ген *Vсhe*, активность бутирилхолинэстеразы, отравление, малатион.

Введение. Бутирилхолинэстераза (БХЭ) выполняет многие функции в организме человека и животных: участвует в передаче нервных импульсов [1] и гидролизует избыток ацетилхолина в нервно-мышечных синапсах [2]. Изменение активности фермента наблюдается при различных патологических состояниях и, в первую очередь, заболеваниях печени, анемии, новообразованиях, кахексии и хронических инфекциях. БХЭ образует комплекс с рядом токсиантов, относящихся к классу фосфорорганических соединений (ФОС), включая пестициды (малатион, хлорпирифос, диазинон) и отравляющие вещества (зарин, зоман, Vx) [3]. При отравлении этими ядами наблюдается выраженное снижение активности фермента [4].

При любом варианте поражения ФОС первичный контакт яда с холинэстеразой плазмы крови происходит в сосудистом русле, субстратом которой является бутирилхолин. Это обстоятельство позволяет рассматривать БХЭ в своем роде «буферной системой» между ядом и органами-мишенями. За счет такого действия БХЭ предохраняет АХЭ нервно-мышечных синапсов от ингибирования ФОС, а ее активность может служить критерием адекватности проведения терапии и исхода интоксикации ФОС [5].

До настоящего времени лечение отравлений ядом ФОС и, в первую очередь, малатионом сопряжено с недостаточной эффективностью средств антидотной терапии (атропин) и реаквационной способностью дипироксима, рекомендован-

Бабкин Александр Владимирович (Babkin Aleksandr Vladimirovich), научный сотрудник НИИИ ВМ ВМедА им. С.М. Кирова Министерства обороны Российской Федерации, 195043, г. Санкт-Петербург, babkinnik@yandex.ru

Бердинских Ирина Сергеевна (Berdinskikh Irina Sergeevna), научный сотрудник НИИИ ВМ ВМедА им. С.М. Кирова Министерства обороны Российской Федерации, 195043, г. Санкт-Петербург, irina_berdinskikh@mail.ru

Осечкина Наталья Сергеевна (Osechkina Natalya Sergeevna), младший научный сотрудник НИИИ ВМ ВМедА им. С.М. Кирова Министерства обороны Российской Федерации, 195043, г. Санкт-Петербург, dunats@rambler.ru

Назаров Георгий Валерьевич (Nazarov Georgiy Valerevich), доктор химических наук, доцент, начальник отдела НИИИ ВМ ВМедА им. С.М. Кирова Министерства обороны Российской Федерации, 195043, г. Санкт-Петербург, denis-100@list.ru

Юдин Михаил Анатольевич (Judin Mikhail Anatol'evich), кандидат медицинских наук, доцент, заместитель начальника отдела НИИИ ВМ ВМедА им. С.М. Кирова Министерства обороны Российской Федерации, 195043, г. Санкт-Петербург, mikhail.judin@gmail.com

Быков Владимир Николаевич (Bykov Vladimir Nikolaevich), доктор медицинских наук, доцент, начальник центра НИИИ ВМ ВМедА им. С.М. Кирова Министерства обороны Российской Федерации, 195043, г. Санкт-Петербург, bykov_imm@yahoo.com.

Сарана Андрей Михайлович (Sarana Andrey Mikhailovich), кандидат медицинских наук, доцент, начальник отделения реабилитации СПб ГБУЗ «Городская больница № 40», г. Сестрорецк, 197706, г. Санкт-Петербург

ного для применения в гражданском здравоохранении. Особенности протекания отравлений малатионом и недостаточный биологический отклик в ответ на прием фармакологических средств может обуславливаться полиморфизмом генов, обеспечивающих регуляцию холинергической системы. О вероятной роли генетических различий также указывают данные об индивидуальности течения интоксикации и степени ингибирования БХЭ у животных одного и того вида.

Показано, что активность БХЭ может определяться структурными особенностями гена, кодирующего наработку этого фермента. Ген *Bche* локализован на длинном плече второй хромосомы (локус 2q32) и содержит значительное число однонуклеотидных замен (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) [6]. Встречаются сведения о влиянии полиморфизма гена *Bche* на ферментативную активность БХЭ человека [7, 8, 9, 10]. В то же время влияние полиморфизма гена *Bche* на активность БХЭ, а также ее восстановление при воздействии малатионом ранее не было исследовано.

В связи с этим целью настоящей работы было исследование ассоциации полиморфных вариантов гена *Bche* белых беспородных крыс с активностью БХЭ после отравления малатионом.

Материалы и методы исследования. Работа выполнена в соответствии с Национальными и Международными Правилами работы с лабораторными животными, а ее выполнение санкционировано Комиссией по биоэтике (IACUC), утвержденной начальником Института от 19.11.2009 г. Эксперименты выполнены на белых нелинейных крысах-самцах массой 180–240 г, содержащихся в условиях вивария (питомник РАМН «Рапполово», Ленинградская область). За 12 ч до начала эксперимента животных лишали пищи. Для моделирования отравления животным однократно внутрижелудочно (в/ж) вводили малатион в дозе 1 ЛД₅₀ (410 мг/кг). В качестве антидота отравлений ФОС всем животным на первых признаках интоксикации внутримышечно вводили атропин в дозе 2 мг/кг, пересчитанной по методике межвидового переноса доз согласно «Руководства...» [11]. При экстраполяции на человека доза атропина соответствовала 20 мг/чел. (лечение тяжелых форм отравлений ФОС). Контрольной группе вводили стерильную воду для инъекций из расчета 1 мл/кг. Наблюдение за животными осуществляли в течение 1 сут.

В этот срок исследовали биохимические и генотипические маркеры интоксикации. Скорость ферментативного гидролиза бутирилтиохолин йодида (субстанции Sigma) определяли в крови, гомогенатах печени и головного мозга при температуре 37,4 °С в среде 0,04 М фосфатного буфера при pH = 7,5 в условиях постоянства concentra-

ции субстрата (метод Эллмана) [12]. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре Hitachi U-2900 при длине волны 412 нм.

Выделение ДНК осуществляли из образцов периферической крови с использованием автоматической станции для выделения нуклеиновых кислот «NorDiag Arrow» (Швеция) и коммерческого набора «Arrow Blood DNA Kit 500» (Швеция) по протоколу «DNA Blood 500». Концентрацию выделенной ДНК определяли с использованием спектрофотометра «BioSpec-nano» (Япония).

Для определения полиморфизмов гена *Bche* проводили полимеразно-цепную реакцию в реальном времени (ПЦР-РВ) на амплификаторе «QuantStudio 12K Flex», «Applied Biosystems» (США), с использованием коммерческих праймеров и зондов, нанесенных производителем на пластины «OpenArray». С использованием робота «OpenArray AccuFill System» на пластины «OpenArray» наносили реакционную смесь для генотипирования TaqMan® OpenArray® Genotyping Master Mix, деионизованную воду и образцы ДНК [13]. Термоциклирование пластин «OpenArray» проводили по следующей программе: 95 °С – 600 с – 1 цикл; (92 °С – 15 с, 60 °С – 60 с) – 40 циклов. При анализе данных ПЦР-РВ использовали программное обеспечение «HOME Genotyper».

Статистическую обработку результатов осуществляли с использованием программы Statistica 8.0. Проверка соответствия распределения показателей активности БХЭ в печени нормальному распределению была проведена с использованием критерия Колмогорова-Смирнова. Для сравнения уровней активности БХЭ при носительстве различных генотипов использовали t-критерий Стьюдента.

Результаты и обсуждение. На основании информационно-теоретического поиска определен перечень вариаций гена *Bche*, ответственных за ферментативную активность БХЭ. Установлено, что частоты полиморфных вариантов гена *Bche* (SNPID rs198598583, rs106414162, rs107226860, rs106296908, rs106118718, rs105196691) оказывают наиболее выраженное влияние на активность БХЭ. Два из них расположены в экзонах (кодирующей области гена), 3 других в интронах (некодирующей части гена), а также еще 1 расположен в 3'-области гена [6]. Анализ образцов ДНК, выделенных из периферической венозной крови крыс, позволил выявить частоты полиморфных вариантов гена *Bche* (табл. 1).

У исследуемых животных показано отсутствие разнообразия среди генетических вариантов G>A (rs106414162), A>G (rs106296908), C>T (rs105196691) гена *Bche*. Следовательно, можно предположить, что данные полиморфизмы гена *Bche* не оказывают влияния на активность фермента БХЭ.

Таблица 1

Частота встречаемости полиморфных вариантов гена *Bche* у крыс после отравления малатионом в дозе 1 ЛД₅₀ и терапии атропином (2 мг/кг, в/м)

№ п/п	Полиморфные варианты гена <i>Bche</i>	Частота встречаемости генотипов, N		
		NN	NM	MM
1	T>C (rs198598583)	13 (44,8)	16 (55,2)	0 (0)
2	G>A (rs106414162)	29 (100)	0 (0)	0 (0)
3	A>T (rs107226860)	12 (41,4)	17 (58,6)	0 (0)
4	A>G (rs106296908)	29 (100)	0 (0)	0 (0)
5	G>T (rs106118718)	13 (44,8)	16 (55,2)	0 (0)
6	C>T (rs105196691)	29 (100)	0 (0)	0 (0)

Примечание: 1 – NN – гомозигота по «дикому» аллелю, NM – гетерозигота, MM – гомозигота по «редкому» аллелю; 2 – в скобках указана частота встречаемости полиморфных вариантов гена *Bche*.

В противоположность этому полиморфизмы T>C (rs198598583), G>T (rs106118718), A>T (rs107226860) формировали различные генотипы с относительно схожими частотами. В оцениваемой выборке не наблюдали ни одного животного с гомозиготными генотипами по «редким» аллелям, что может объясняться малой частотой их представленности в популяции крыс.

Полученные данные позволили выделить три основных полиморфизма гена *Bche*, которые могут влиять на ферментативную активность БХЭ в организме крыс: T>C (rs198598583), G>T (rs106118718), A>T (rs107226860). Среди исследованной выборки животных проведен анализ ассоциации вариантов гена *Bche* с активностью БХЭ, при этом только для ткани печени показана корреляция показателей. Для всех трех вариантов полиморфизма гена *Bche* было характерно сцепленное наследование.

Результаты активности БХЭ печени в зависимости от полиморфизма гена *Bche* через 1 сутки после отравления крыс малатионом в дозе 1 ЛД₅₀ и терапии атропином (2 мг/кг, в/м) представлены на рисунке 1.

Для исследованных групп характерно отсутствие межгрупповых отличий по гетерозиготному или гомозиготному вариантам полиморфизма гена *Bche*. У крыс с гомозиготным вариантом генотипа, независимо от полиморфизма гена *Bche*, активность фермента была достоверно (при $p \leq 0,05$) выше на 30 % по сравнению с БХЭ животных с гетерозиготным генотипом.

Особенности эстеразного статуса позволили

предположить о ведущей роли гомозиготных вариантов гена *Bche* в восстановлении активности БХЭ в ткани печени на фоне ее тотального ингибирования (до 80%) малатионом в течение 1–2 ч после отравления.

Полученные данные свидетельствуют о наличии ассоциации всех трех исследованных вариантов гена *Bche* с активностью БХЭ в печени через 1 сутки после отравления крыс малатионом в дозе 1 ЛД₅₀. По уровню статистической значимости наибольшая корреляционная связь активности БХЭ в печени прослеживалась для крыс с генотипом A>T (rs107226860) и G>T (rs106118718).

Результаты изучения особенностей протекания отравления ФОС и эстеразного статуса в зависимости от полиморфизма генотипа гена *Bche* у животных подтверждаются данными оценки зависимости полиморфизма гена, кодирующего БХЭ, с ее ферментативной активностью у человека. Так, у носителей мутации (A>G, rs1799807) активность БХЭ значительно ниже, а в ряде случаев практически не прослеживается [9]. Данный факт может быть обусловлен наработкой фермента с измененной пространственной структурой эстеразного участка. Показано, что точечная мутация (G>A, rs1803274), определяющая так называемый «К-вариант» БХЭ, приводит к снижению активности фермента в среднем до 30% от внутрипопуляционной нормы [7]. В то же время существуют варианты гена, кодирующего БХЭ человека, ассоциированного с повышенной активностью БХЭ. Так, например, у носителей «йоханнесбургского» варианта, выявленного в

южноафриканской популяции, наблюдаются более высокие показатели активности БХЭ по сравнению с общей популяцией в среднем в 2–3 раза [8]. Показано, что у лиц с вариантом БХЭ, устойчивой к ингибированию 0,05 мМ раствором фторида натрия, обнаруживались одна или две мутации в гене БХЭ (Thr271Met, rs28933389; Gly418Val rs28933390) [10].

Проведенное исследование продемонстрировало достоверную ($p < 0,05$) ассоциацию вариантов Т>С (rs198598583), G>Т (rs106118718), А>Т (rs107226860) гена *Bche* с активностью БХЭ в печени после отравления малатионом в дозе 1 ЛД₅₀ и терапии атропином (2 мг/кг, в/м). Носители гетерозиготных генотипов (СТ, АТ и GT соответственно) обладали более низкой ферментативной активностью БХЭ в печени через 1 сутки после введения ФОС, в сравнении с носителями гомозиготных генотипов по «диким» аллелям. Следовательно, можно предположить, что крысы с гомозиготными генотипами по «диким» аллелям должны быть более устойчивы к воздействию ФОС. Варианты гена *Bche* Т>С (rs198598583) и G>Т (rs106118718) предположительно наследуются сцепленно, то есть генотипу ТТ соответствует генотип GG. Поэтому влияние на активность БХЭ в печени через 1 сутки после отравления малатионом в дозе 1 ЛД₅₀ одного из полиморфных вариантов может объясняться влиянием второго варианта.

Эти и другие особенности генетического профиля с активностью БХЭ имеют принципиальное значение при разработке средств фармакологической коррекции поражений ФОС. Данные исследования полиморфизма гена *Bche* в острый период отравления крыс малатионом на уровень активности БХЭ позволяют сформировать новые подходы для оценки эффективности существующих средств лечения поражений ФОС, равно как и определить новые направления для разработки средств лечения, основанных на инженерной биотехнологии, используя при этом биологическую модель отравления на крысах.

Заключение. В ходе экспериментальных исследований установлено, что полиморфные варианты Т>С

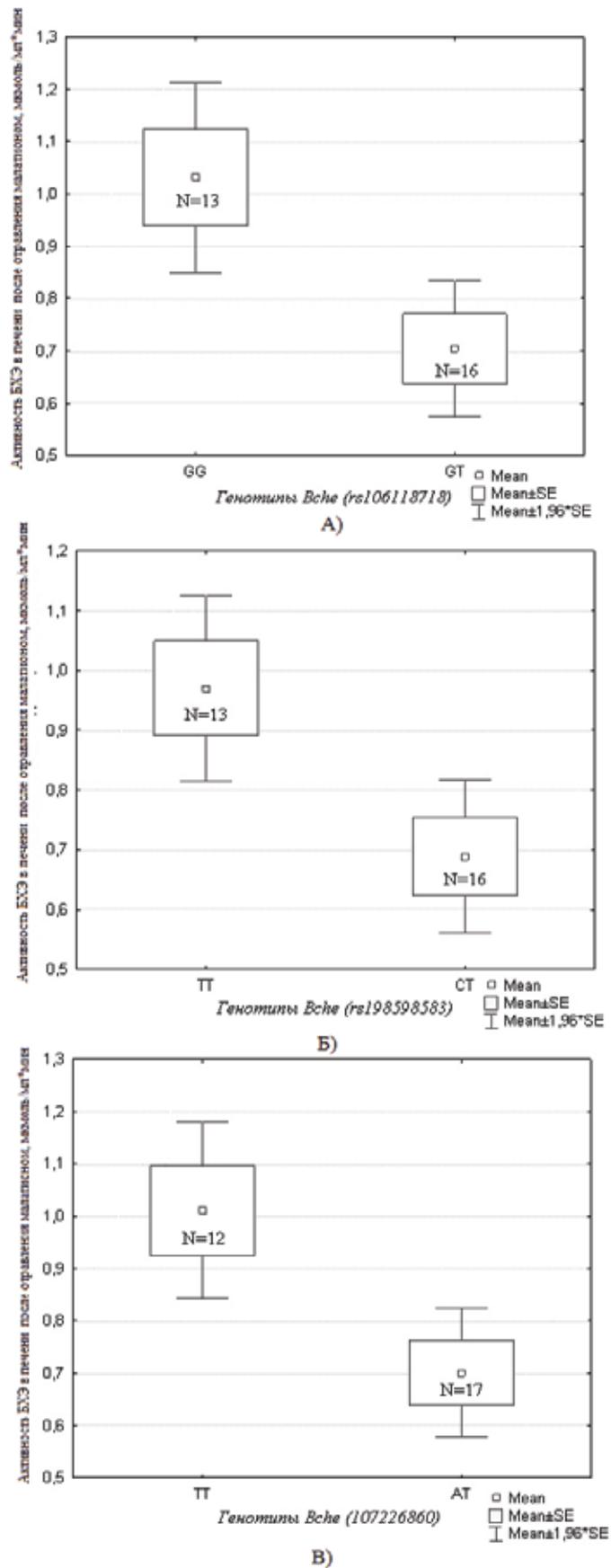


Рис. 1. Активность БХЭ в печени крыс через 1 сутки после отравления малатионом (1 ЛД₅₀) и терапии атропином (2 мг/кг, в/м) в зависимости от полиморфизма G>Т (rs106118718) (А), Т>С (rs198598583) (Б), А>Т (rs107226860) (В) гена *Bche*

(rs198598583), G>T (rs106118718), A>T (rs107226860) гена *Bche* определяют активность БХЭ в печени крыс через 1 сутки после отравления малатионом в дозе 1 ЛД₅₀. Наибольшая корреляционная связь активности фермента в печени прослежена для аллельных вариантов A>T (rs107226860) и G>T (rs106118718) и гомозиготным вариантом генотипа.

Наличие полиморфизма в гене *Bche* обуславливает различный профиль активности БХЭ

и, предположительно, различную реакцию животных одного и того вида в ответ на введение малатиона в дозе 1 ЛД₅₀. Результаты изучения полиморфизма гена, кодирующего БХЭ после выполнения дополнительных исследований, могут быть использованы для обоснования схем применения рекомендованных средств лечения отравлений ФОС, а также разработки новых средств патогенетической терапии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Giasobini E.* Cholinesterases: new roles in brain function and in Alzheimer's disease. *Neurochem. Res.* 2003; 28: 515–522.
2. *Girard E. et al.* Butyrylcholinesterase and the control of synaptic responses in acetylcholinesterase knockout mice. *Life Sci.* 2007; 80 (24–25): 2380–2385.
3. *Broomfield C.A. et al.* Protection by butyrylcholinesterase against organophosphorus poisoning in nonhuman primates. *J Pharmacol Exp Ther.* 1991; 259 (2): 633–638.
4. *Дёгтева С.Д., Старостина В.К.* Холинэстераза: методы анализа и диагностическое значение. *Новости «Вектор-Бест».* 2008; 1 (47): 5–7.
5. *Bajgar J. et al.* Changes of cholinesterase activities in the rat blood and brain after sarin intoxication pretreated with butyrylcholinesterase. *Drug Chem. Toxicol.* 2007; 30 (4): 351–359.
6. SNP of *Bche* gene. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp?LinkName=gene_snp&from_uid=65036 (accessed 1 May 2014).
7. *Bartels C. F. et al.* DNA mutation associated with the human butyrylcholinesterase K-variant and its linkage to the atypical variant mutation and other polymorphic sites. *Am. J. Hum. Genet.* 1992; 50: 1086–1103.
8. *Krause A., Lane A.B., Jenkins T.A.* A new high activity plasma cholinesterase variant. *J Med Genet.* 1988; 25(10): 677–681.
9. *McGuire M. C. et al.* Identification of the structural mutation responsible for the dibucaine-resistant (atypical) variant form of human serum cholinesterase. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1989; 86: 953–957.
10. *Nogueira C. P. et al.* Identification of two different point mutations associated with the fluoride-resistant phenotype for human butyrylcholinesterase. *Am. J. Hum. Genet.* 1992; 51: 821–828.
11. *Миронов А.Н.* Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М., 2012.
12. *Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V. Jr., Featherstone R.M.* A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 1961; 7: 88–95.
13. *TaqMan® OpenArray® Genotyping. Getting Started Guide* (2010). Available at: http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cms_058198.pdf (accessed 1 May 2014).

REFERENCES:

1. *Giasobini E.* Cholinesterases: new roles in brain function and in Alzheimer's disease. *Neurochem. Res.* 2003; 28: 515–522.
2. *Girard E. et al.* Butyrylcholinesterase and the control of synaptic responses in acetylcholinesterase knockout mice. *Life Sci.* 2007; 80 (24–25): 2380–2385.
3. *Broomfield C.A. et al.* Protection by butyrylcholinesterase against organophosphorus poisoning in nonhuman primates. *J Pharmacol Exp Ther.* 1991; 259 (2): 633–638.
4. *Djogteva S.D., Starostina V.K.* Cholinesterase: methods of analysis and diagnostic importance. *Novosti «Вектор-Бест».* 2008; 1 (47): 5–7 (in Russian).
5. *Bajgar J. et al.* Changes of cholinesterase activities in the rat blood and brain after sarin intoxication pretreated with butyrylcholinesterase. *Drug Chem. Toxicol.* 2007; 30 (4): 351–359.
6. SNP of *Bche* gene. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp?LinkName=gene_snp&from_uid=65036 (accessed 1 May 2014).
7. *Bartels C. F. et al.* DNA mutation associated with the human butyrylcholinesterase K-variant and its linkage to the atypical variant mutation and other polymorphic sites. *Am. J. Hum. Genet.* 1992; 50: 1086–1103.
8. *Krause A., Lane A.B., Jenkins T.A.* A new high activity plasma cholinesterase variant. *J Med Genet.* 1988; 25(10): 677–681.
9. *McGuire M. C. et al.* Identification of the structural mutation responsible for the dibucaine-resistant (atypical) variant form of human serum cholinesterase. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1989; 86: 953–957.
10. *Nogueira C. P. et al.* Identification of two different point mutations associated with the fluoride-resistant phenotype for human butyrylcholinesterase. *Am. J. Hum. Genet.* 1992; 51: 821–828.
11. *Mironov A.N.* Guidelines for pre-clinical trials of drugs. Part 1. Moscow. 2012 (in Russian).
12. *Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V. Jr., Featherstone R.M.* A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 1961; 7: 88–95.
13. *TaqMan® OpenArray® Genotyping. Getting Started Guide* (2010). Available at: http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cms_058198.pdf (accessed 1 May 2014).

A.V. Babkin¹, I.S. Berdinskih¹, N.S. Osechkina¹, G.V. Nazarov¹, M.A. Judin¹, V.N. Bykov¹, A.M. Sarana²

ASSOCIATION OF BCHE GENE POLYMORPHIC VARIANTS WITH BUTYRYLCHOLINESTERASE ACTIVITY IN RATS POISONED WITH MALATHION

¹Scientific Research Test Institute of Military Medicine, S.M. Kirov Medical Military Academy, 195043, Saint-Petersburg, Russian Federation

²City Hospital № 40, 197706 Sestroretsk, Saint-Petersburg, Russian Federation

The association of *Bche* gene polymorphisms with butyrylcholinesterase activity was investigated on a model of rats poisoned with malathion at a dose of 1 LD₅₀. The genotype distribution of six polymorphic variants of *Bche* gene was studied. An authentic association ($p < 0.05$) of variants T>C (SNPID rs198598583), G>T (SNPID rs106118718), A>T (SNPID rs107226860) with butyrylcholinesterase activity in the liver tissue a day after poisoning was shown; the prevalence of those polymorphic variants is associated with linked type of inheritance. The highest linkage correlation of the enzyme activity in the liver was observed in variants A>T (rs107226860) and G>T (rs106118718). Enzyme activity in rats with a homozygous genotype was authentically higher (by 30 %) compared to the heterozygous genotype.

Key words: *gene polymorphism, Bche gene, butyrylcholinesterase activity, intoxication, malathion*

Материал поступил в редакцию 9.07.2014 г.