Биомедицинская химия, 2017 том 63, вып. 6, с. 559-564.

©Коллектив авторов

ВЛИЯНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ ОБРАБОТКИ КОРМОВОЙ ЗЕРНОСМЕСИ ОТ ХЛОРПИРИФОСА НА БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ КРЫС

О.В. Маслова, О.В. Сенько, Е.Н. Ефременко*

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет,
119991, Москва, Ленинские горы, 1/3; эл. почта: elena_efremenko@list.ru

Фосфорорганические пестициды (ФОП) используются для защиты сельскохозяйственных культур от вредителей. Обработка пестицидами растений и животных производится не только во время их выращивания, а также при получении готовой продукции и создании условий для её длительного хранения. В настоящее время существует большое количество препаратов, предназначенных для профилактики и лечения последствий интоксикаций живых организмов под действием ФОП. Актуальной является разработка биопрепаратов для деградации ФОП и технологий их применения в сельском хозяйстве. Для детоксификации ФОП разработаны новые биопрепараты на основе стабилизированных форм фермента гексагестидинсодержащей органофосфатгидролазы (His_6-ОРН) в виде наноразмерных частиц, представляющих собой фермент-полиэлектролитные комплексы (ФПК), сформированные путём смешивания в определенных условиях His_6-ОРН с полианионом. Целью данной работы была оценка эффективности использования ранее разработанных ФПК на основе His_6-ОРН и полиглутаминовой кислоты для детоксификации ФОП путём анализа биохимических показателей крови крыс, потребляющих зерносмесь, исходно содержащую хлорпирифос. В экспериментах на самках белых крыс установлено, что обработка в течение 24 ч кормовой зерносмеси, исходно содержащей хлопририфос в концентрации 48 мг/кг смеси, ферментным препаратом на основе His_6-ОРН в дозе 1000 Ед/ кг смеси является эффективной. Результаты исследований показали, что у крыс той группы, что потребляла корм после ферментативного удаления хлорпирифоса, уровень активности ацетилхолинэстеразы в крови был сопоставим с тем, что был у крыс, потреблявших чистый исходный корм.

Ключевые слова: гексагистидинсодержащая органофосфатгидролаза, фосфорорганические пестициды, гидролиз, медико-биологический анализ крови

DOI: 10.18097/PBMC20176306559

ВВЕДЕНИЕ

Фосфорорганические пестициды (ФОП) давно и успешно используются для защиты сельскохозяйственных культур от вредителей [1] и составляют почти 40% от числа всех пестицидов, применяемых в растениеводстве и животноводстве. Обработка пестицидами растений (злаковые, бахчевые, цитрусовые и т.д.) и животных производится не только во время их выращивания, а также при получении готовой продукции и создании условий для её длительного хранения (урожая овощей, фруктов, зерна, шкур, шерсти, хлопковых тканевых изделий и др.).

Исходя из проекта Технического регламента Таможенного союза “О безопасности кормов и кормовых добавок”, содержание фосфорорганических соединений в животных кормах до сих пор не регламентировано. Установлено, что 22% кормов, изготавливаемых из различных видов сырья и предназначенных для кроликов, цыплят, кур и лошадей, контаминированы хлорпирифосом в концентрациях 0,018-0,148 мг/кг [2], превышающих предельные нормы по содержанию этого пестицида в зерне. Из другого исследования известно, что более 60% кормов, взятых для анализа с разных континентов из различных стран, контаминировано одним или несколькими фосфорорганическими соединениями (ФОС), преимущественно пиримифосметилом, глифосатом и его производными, а также хлорпирифосом и хлорпирифосметилом в концентрациях, превышающих норму до 18 раз [3].

Таким образом, отравления животных под действием ФОП при употреблении ими некачественного корма, представляют собой актуальную проблему. Острые отравления протекают тяжело, характеризуются высокой летальностью, патологическими состояниями, изменением важнейших медико-биологических характеристик [1]. Несмотря на комплекс санитарно-гигиенических мероприятий, направленных на профилактику интоксикаций при использовании пестицидов в сельском хозяйстве, случаи отравлений ими продолжают регистрироваться [1, 4].

Особую опасность на сегодняшний день представляет проблема, связанная с попаданием остаточных количеств ФОС в организм человека, например, с продуктами, прошедшими специальную обработку с использованием ФОП, и поэтому представляющими потенциальную угрозу его здоровью [4, 5]. Известно, что все ФОС обладают кумулятивным эффектом, то есть по мере накопления этих веществ в живом организме их токсичность проявляется наиболее выражено [6]. Интоксикация живого организма проявляется в изменении биохимических показателей крови, главным образом, в снижении активности ацетилхолинэстеразы (АХЭ), способствует развитию ряда нейродегенеративных заболеваний [7, 8].

* - адресат для переписки

В настоящее время существует большое количество препаратов, предназначенных для профилактики и лечения последствий интоксикаций живых организмов, возникающих под действием ФОП. Однако, недостаточная эффективность общепринятых мер терапии обуславливают актуальность поиска и разработки новых эффективных препаратов и способов их использования, в потенциале позволяющих предотвращать возможности острого отравления и/или накопления ФОП в организмах животных и человека.

Актуальной является разработка биопрепаратов для деградации ФОП и технологий их применения в сельском хозяйстве, в частности, для удаления остатков ФОП из сельскохозяйственного сырья и из кормов для животных, которые могут изготавливаться из загрязнённого фосфорорганическими нейротоксикантами сырья.

Гексагестидинсодержащая органофосфатгидролаза (His_6-OPH) представляет собой гомодимерный белок (72 кДа, d ~4 нм), на N-конец молекулы которого генетически введена последовательность из шести остатков гистидинов; фермент обладает гидролитической активностью по отношению к широкому спектру ФОП, содержащих P-O и P-S связи в производных ортофосфорной кислоты. Получение His_6-OPH осуществляется с использованием рекомбинантных клеток *Escherichia coli* SG13009[pREP4], содержащих ранее специально созданную плазмиду, кодирующую синтез данного фермента [9]. Выделение и очистка His_6-OPH до получения высокоочищенного ферментного препарата осуществляется с использованием металло-хелатирующей хроматографии по оптимизированной процедуре [10]. У данного фермента также установлена лактоназная активность по отношению к ацилгомосеринлактонам – индукторам формирования кворумного ответа у многих грамотрицательных бактерий-патогенов [11], что делает применение этого фермента на практике ещё более привлекательным.

Для детоксификации ФОП разработаны новые биопрепараты на основе стабилизированных форм фермента гексагестидинсодержащей органофосфатгидролазы (His_6-OPH) в виде наноразмерных частиц, представляющих собой фермент-полиэлектролитные комплексы (ФПК), сформированные путём смешивания в определенных условиях растворов His_6-OPH и полианиона [12, 13]. Благодаря таким уникальным свойствам, как отсутствие токсичности и иммуногенности в целом использование полимеров аминокислот для формирования ФПК и стабилизации активности ферментов является наиболее обоснованным в случае медицинского, фармацевтического и пищевого их применения. Такие ФПК уже хорошо зарекомендовали себя, с точки зрения возможности стабилизации фермента His_6-OPH и длительного его действия при использовании для детоксификации ФОП в различных почвогрунтах [14]. Установлено также, что при введении в организм крыс различными методами (внутривенно, внутримышечно, трансбуккально) подобные ФПК характеризуются повышенной стабильностью и обладают пролонгированным каталитическим действием в реакции гидролиза ФОП *in vivo* [15-17].

Целью данной работы была оценка эффективности использования ранее разработанных ФПК на основе His_6-OPH и полиглутаминовой кислоты [11, 16, 17] для детоксификации ФОП на примере Дурсбана (хлорпирифоса), присутствующих в составе зерносмеси, на биохимические показатели крови крыс.

МЕТОДИКА

Эксперимент проводили на 30 самках белых крыс линии Sprague Dawley возрастом от 60 до 90 дней массой 240 г, выращенных в питомнике для лабораторных животных Филиала Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (Пущино, Россия). Животных содержали в просторных клетках по 3-4 головы при 8-часовом дневном освещении, температурном режиме содержания 20-25°C, с режимом кормления *ad libitum*. Содержание животных в условиях вивария соответствовало ГОСТ Р ИСО 10993-2-2009 “Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 2. Требования к обращению с животными” и “Правилам лабораторной практики” (Приказ Минздравсоцразвития России от 23 августа 2010 г. № 708н). В качестве монокорма использовали зерносмесь Benelux (корм для мышей, хомяков и крыс) (“Benelux”, Бельгия) с добавлением коммерческого препарата Дурсбан (Dursban 480) (“Dow AgroSiences LLC”, США), содержащего 480 г хлорпирифоса, в 1 л и без него. Дурсбан перед приготовлением рабочего раствора тщательно перемешивался в заводской упаковке, нужное количество разбавляли водой, и в виде спрея препарат вводили в зерносмесь в концентрации 0,1 мл/кг зерносмеси (48 мг хлорпирифоса/ кг зерносмеси).

Для обработки зерносмеси использовался фермент-полиэлектролитный комплекс (ФПК) на основе His_6-OPH и полиглутаминовой кислоты ($ПГК_{50}$; M=7500 Да). ФПК готовили с использованием ранее разработанной методики [11]. Аликвоту His_6-OPH в 0,1 М фосфатном буфере, pH 7,5, (концентрация белка 0,16±0,01 мг/мл, удельная активность по хлорпирифосу – 360 Ед/мг) смешивали с аликвотой раствора $ПГК_{50}$ (20 мг/мл) в дистиллированной воде таким образом, чтобы мольное соотношение фермент : полимер составляло 1:5. Для получения ФПК растворы полимера и фермента перемешивали и выдерживали 30 мин при +8°C. Эффективный гидродинамический диаметр полученных частиц ФПК при 25°C, определялся с использованием Zetasizer Nano ZS (“Malvern Instruments Ltd.”, Великобритания) и составил 35±5 нм.

При необходимости зерносмесь, содержащую Дурсбан, опрыскивали спреем на основе 0,1 М фосфатного буфера (pH 7,5), содержащего ФПК, с расчётом 500-2000 Ед/кг зерносмеси, после чего смесь механически перемешивали и выдерживали в течение 12-48 ч при 25°C. Полученную

в результате обработки ФПК зерносмесь использовали для анализа остаточного содержания хлорпирифоса и кормления животных.

Животные были разделены на три группы: I группа "Норма" – 8 животных, потреблявших исходную зерносмесь без ФОП, II группа "Контроль" – 11 животных, потреблявших корм с ФОП без детоксификации, III группа "Опыт" – 11 животных, потреблявших зерносмесь после ферментативной очистки от ФОП. Животные всех групп содержались в виварии в течение 1 месяца. Среднесуточное потребление зерносмеси на одно животное составляло 30±2 г. В случае корма, содержащего Дурсбан, расчётное суточное потребление хлорпирифоса составляло 5,76 мг/кг, что соответствовало 1/23-1/28 от LD_{50} (135-163 мг/кг).

Для анализа концентрации хлорпирифоса, навеску (3 г) зерносмеси измельчали, проводили трёхкратную экстракцию ФОП этилацетатом (15 мл), полученные фракции объединяли, упаривали и растворяли в ацетонитриле. Экстракты анализировали с использованием ВЭЖХ ("Knauer Smartline Pump 1000", Германия) на колонке для обращённо-фазовой хроматографии Диасфер 110-С18 ("Биохиммак СТ", Россия) (5 мкм, 4,0×250 мм) со спектрофотометрическим детектором и изократическим элюированием. В качестве элюента использовали смесь ацетонитрил:вода (60:40). Время удерживания хлорпирифоса (OD_{225}) составляло 31 мин. Скорость подачи элюента – 1 мл/мин, температура ячейки детектора 25°С. Объём вводимой пробы – 20 мкл.

Для получения сыворотки кровь, отобранную после декапитации, выдерживали 40 мин и центрифугировали 15 мин, 1500 g. В сыворотке крови, полученной от контрольных и опытных животных, определялся уровень общего белка, глюкозы, холестерина, креатинина, мочевины, а также активность аланинаминотрансферазы (АлАТ) и аспартатаминотрансферазы (АсАТ). Биохимические анализы выполняли на автоматическом биохимическом анализаторе Hycel Lisa 300 Plus с использованием коммерческих наборов биохимических реактивов фирмы "НПФ Абрис+" (Россия) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя.

Для оценки эстеразного статуса животных определяли активность фермента ацетилхолинэстеразы (АХЭ) в цельной крови спектрофотометрически по модифицированному методу Эллмана [18, 19]. Активность АХЭ пропорциональна концентрации тиохолина, который образуется в ходе гидролиза ацетилтиохолина и дает жёлтое окрашивание в присутствии реактива Эллмана – 5,5′-дитио-бис-(2-нитробензойной) кислоты (ДТНБ). При реакции сульфгидрильных (тиоловых) групп с реактивом Эллмана происходит разрыв дисульфидной связи в реактиве, и образуется 2-нитро-5-тиобензойная кислота, которая легко переходит в хиноидную форму в воде при нейтральных и щелочных значениях pH и имеет ярко-жёлтую окраску, интенсивность которой регистрируется при 412 нм [20].

Исследование активности АХЭ проводили в термостатируемой ячейке спектрофотометра Agilent 8453 ("Agilent Technology", Германия). Реакционная смесь для определения АХЭ-активности исходно содержала сыворотку крови (l мг/мл белка в кювете), 1,2 мМ ДТНБ, 0,1 М К-фосфатный буфер (pH 8,0). После инкубирования исходной смеси при 37°С в течение 5 мин к ней добавляли 0,5 мМ раствор йодида ацетилтиохолина. После инкубации смеси при 37°С в течение 0,5 ч в пробу вносили раствор прозерина для прекращения ферментативной реакции, и проводили измерение показателя оптической плотности. В контрольную пробу вносили сначала раствор прозерина, а затем все реактивы, как в опытной пробе. Активность АХЭ определяли путём построения калибровочного графика с использованием коммерческого препарата АХЭ из эритроцитов крови человека ("Sigma", США). За единицу АХЭ активности (мкмоль/мг/ч) принимали количество фермента, которое осуществляло гидролиз 1 мкмоль ацетилтиохолина за 1 ч.

Представленные данные относительно исследования возможности очистки зерносмеси от хлорпирифоса с использованием ФПК на основе His_6-ОРН являются результатом по меньшей мере трёх независимых экспериментов ± стандартное отклонение (±SD). Данные относительно исследования биохимических показателей крови животных представляют собой среднее (±SEM) по меньшей мере из восьми животных каждой группы ($p<0,05$). Статистический анализ результатов проводился с использованием программного обеспечения SigmaPlot (ver. 12.5, ""Systat Software Inc.", США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе многофакторного эксперимента была оптимизирована методика обработки зерносмеси, содержащей хлорпирифос, ферментным препаратом-деструктором ФОП в виде ФПК на основе His_6-ОРН. Диапазоны концентрации наносимого на зерносмесь ферментного препарата и время (длительность) контакта с зерносмесью (рисунок) были выбраны исходя из предыдущего практического опыта исследователей, касающегося разложения ФОП в почвах с использованием ФПК на основе His_6-ОРН [14]. Установлено, что оптимальным, с точки зрения быстрого и эффективного разложения ФОП в составе выбранной модельной зерносмеси, содержащей хлорпирифос, является длительность обработки в течение 24 ч и внесение ФПК в расчете 1000 Ед/кг зерносмеси. При таком режиме обработки обеспечивается гидролиз ФОП на 99±1%. Сокращение длительности обработки при увеличении удельной активности препарата, наносимого на единицу массы субстрата является менее целесообразным с экономической точки зрения.

Клинические признаки интоксикации Дурсбаном (хлорпирифосом) у контрольных и опытных животных отсутствовали при их кормлении в течение одного месяца зерносмесью Benelux. Результаты

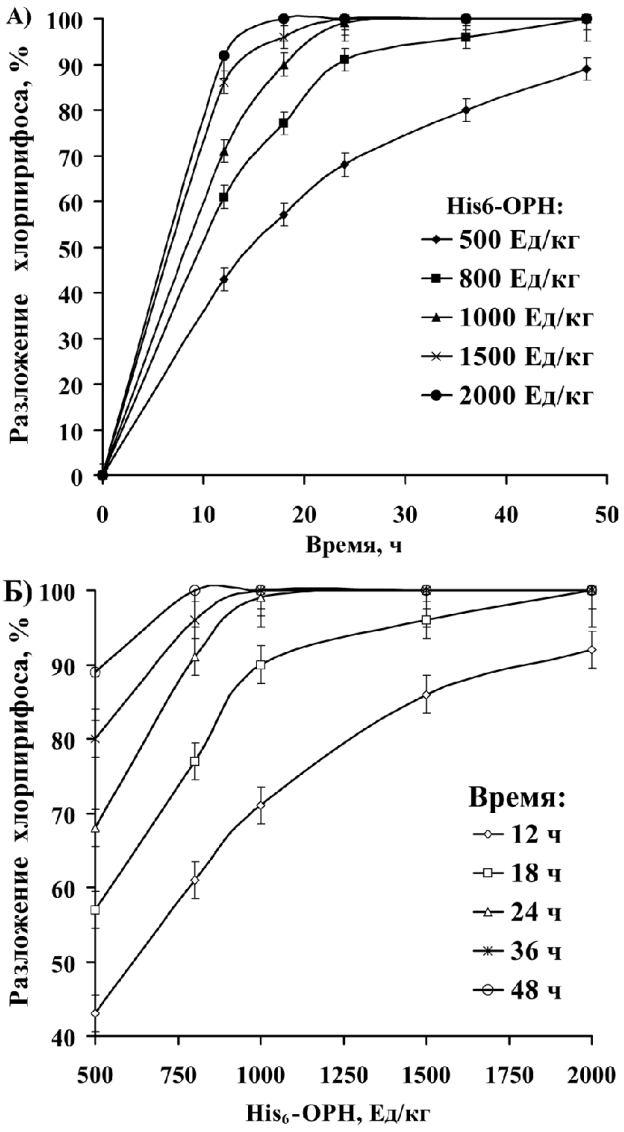

Рисунок. Зависимость степени ферментативного гидролиза хлорпирифоса в зерносмеси от концентрации внесенного ФПК на основе His_6-OPH (А) и от времени экспонирования смеси (Б).

исследования активности ацетилхолинэстеразы (АХЭ) и других биохимических показателей крови животных приведены в таблице, из них следует, что активность АХЭ в крови крыс, получивших интоксикацию ФОП в процессе потребления корма, содержащего Дурсбан (контрольная группа), была ниже нормы на 57,8±2,6%. У животных, питавшихся аналогичным кормом, но прошедшим ферментативную предобработку биопрепаратом на основе His_6-OPH (опытная группа), активность АХЭ была ниже нормы только на 10,1±0,4% по сравнению с животными, питавшимися чистой зерносмесью (интактные животные).

Анализ полученных биохимических показателей крови крыс позволяет сделать вывод о том, что в целом показатели крови животных интактной группы и опытных животных, потреблявших очищенную зерносмесь, соответствуют стандартным значениям. Наблюдаемые незначительные вариации показателей лежат в пределах допустимых погрешностей (таблица). Отмечено, что разница значений показателей концентраций билирубина и креатинина в крови интактной и опытной групп крыс была максимальной по сравнению с другими биохимическими показателями крови, что, вероятно, объясняется возросшей нагрузкой на почки и печень животных, связанной с обезвреживанием и выведением из их организма продуктов ферментативного гидролиза хлорпирифоса под действием His_6-OPH – 3,5,6-трихлор-2-пиридинола и O,O′-диэтилтиофосфата. Известно, что эти продукты также проявляют токсичность, но являются намного менее токсичными, чем хлорпирифос [21, 22].

При этом все исследованные биохимические показатели крови крыс из контрольной группы значительно изменились. При этом значения показателей активности АсАТ, мочевины, глюкозы и белка хоть и изменились, но, остались в пределах варьирования допустимой нормы. Однако, уровни АлАТ, билирубина, креатинина и холестерина у контрольной группы животных после месяца потребления зерносмеси, обработанной Дурсбаном, по сравнению с показателями группы “Норма”, изменились существенно (таблица). В частности,

Таблица. Биохимические показатели крови крыс, потреблявших исходную зерносмесь (норма), корм без детоксификации (контроль) и после ферментативной очистки от ФОП (опыт)

Показатель	Стандартные значения показателей	Группа		
		Норма	Контроль	Опыт
АсАТ, ммоль/л	0,8-2,22	1,25±0,28	1,75±0,32	1,23±0,24
АлАТ, ммоль/л	2,5-3,12	2,8±0,25	**5,3±0,29**	2,9±0,26
Билирубин, мкмоль/л	0-1,67	1,36±0,11	**3,81±0,16**	1,24±0,09
Креатинин, мкмоль/л	68-104	88,6±3,1	**124,1±3,8**	92,1±3,2
Мочевина, ммоль/л	8-14	8,3±0,42	12,7±0,48	8,6±0,43
Холестерин, мкмоль/л	2,2-2,6	2,3±0,14	**1,9±0,12**	2,3±0,13
Глюкоза, ммоль/л	8,8-16,3	13,2±1,14	9,8±0,98	12,8±1,12
Общий белок, г	9,8-10,8	10,1±0,9	9,9±0,8	10,3±0,9
АХЭ, мкмоль/мг/ч	***	58,2±1,9	24,7±1,2	52,3±1,9

Примечание. Параметры, для которых в ходе экспериментов установлены максимальные отклонения от нормальных значений, выделены жирным шрифтом.

отмечены отклонения, выходящие за пределы диапазонов нормальных значений данных показателей, установленных для животных. Возрастание значений показателей АлАТ (на 47,2%) и билирубина (на 64,3%), очевидно, связаны с поражением печени крыс контрольной группы, а креатинина (на 28,6%) – с проблемами в функционировании почек и мочевыделительной системы в целом. Это также подтверждалось и снижением показателя холестерина в крови на 17,4%, вероятно, за счёт снижения функциональных характеристик печени и почек, подвергшихся интоксикации ФОП в результате потребления токсичной зерносмеси. Наблюдаемые отклонения значений показателей АлАТ, билирубина и креатинина в контрольной группе и отсутствие таковых изменений в опытной группе можно рассматривать в качестве биохимических признаков развития токсического гепатита. Однако, для постановки точного клинического диагноза требуется проведение дополнительных исследований, выходящих за рамки данной исследовательской работы.

В данной работе фермент His_6-ОРН, гидролизующий ФОП, использовался именно в форме ФПК, то есть в стабилизированном виде, поскольку pH оптимум действия этого фермента (10,5) существенно выше величины pH, характерной для пищевых продуктов, в частности, для зерносмеси.

В результате было показано, что использование фермента His_6-ОРН в таком виде является эффективным для очистки зерносодержащего корма от ФОП. Среди преимуществ ФПК можно выделить то, что они могут быть приготовлены путём простого смешивания в определённой пропорции растворов фермента и полимера, выполняющих роль противоположно заряженных ионитов, взятых в определённой концентрациях, которые устанавливаются экспериментально. Стабилизация фермента позволила сохранить его активность и при значениях pH среды, близких к нейтральным, и в условиях нанесения в виде спрея на твердые частицы зерносмеси при комнатной температуре в течение 2 суток. Следует отметить, что использование именно $ПГК_{50}$ в качестве партнёра фермента в составе ФПК привлекательно потому, что в случае биодеградации таких ФПК в условиях окружающей среды и в живых организмах происходит высвобождение нетоксичных аминокислотных остатков, которые служат легко усваиваемыми дополнительными источниками аминокислот.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

В экспериментах на самках белых крыс установлено, что обработка в течение 24 ч кормовой зерносмеси, исходно содержащей Дурсбан (хлорпирифос) в концентрации 48 мг/кг смеси, ферментным препаратом в виде ФПК на основе His_6-ОРН и полиглутаминовой кислоты, наносимым таким образом, чтобы активность составила 1000 Ед на кг смеси, является эффективной и позволяет поддерживать исследованные биохимические показатели крови модельных животных (крыс) в пределах значений, соответствующих нормам.

Результаты исследований свидетельствуют о том, что у крыс контрольной группы, потреблявших обработанный Дурсбаном корм, уровень активности АХЭ в крови был ниже, чем у крыс потреблявших аналогичный корм, но после его обработки ферментным препаратом. Помимо сохранения активности АХЭ в крови отмечена нормализация основных биохимических показателей крови животных, изменённых под действием ФОП.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа поддержана грантом РНФ № 16-14-00061.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Аймалетдинов А.М., Асланов Р.М., Гареев Р.Д., Маланьев А.В.* (2013) Ветеринарная мед., **97**, 412-413.
2. *Gómez-Pérez M.L., Romero-González R., Martínez Vidal J.L., Garrido Frenich A*. (2015) Food Addit. Contam. Part A, 1-10, DOI:10.1080/19440049.2015.1023742.
3. *Mesnage R., Defarge N., Rocque L.M., Spiroux de Vendômois J., Séralini G.E.* (2015) PLoS One, **10**(7), e0128429, DOI: 10.1371/journal.pone.0128429.
4. *Eddleston M., Buckley N.A., Eyer P., Dawson A.H.* (2008) The Lancet, **371**(9612), 597-607.
5. *Margni M., Rossier D., Crettaz P., Jolliet O.* (2002) Agric. Ecosyst. Environ., **93**(1), 379-392.
6. *Bhanti M., Taneja A*. (2007) Chemosphere, **69**(1), 63-68.
7. *Nigg H.N., Knaak J.B.* (2000) In: Reviews of environmental contamination and toxicology (Whitacre D.M., ed.) Springer, New York, pp. 29-111.
8. *Ballantyne B., Marrs T. C*. (2017) Clinical and Experimental Toxicology of Organophosphates and Carbamates, Butterworth Heinemann, Oxford, 641 p.
9. *Ефременко Е.Н., Вотчицева Ю.А., Алиев Т.К., Варфоломеев С.Д.* (2005) Патент РФ на изобретение 2255975. Опубликовано 10.07. 2005 в Бюлл. изобретений №19.
10. *Efremenko E., Votchitseva Y., Plieva F., Galaev I., Mattiasson B.* (2006) Appl. Microbiol. Biot., **70**(5), 558-563.
11. *Maslova O., Aslanli A., Stepanov N., Lyagin I., Efremenko E.* (2017) Catalysts, **7**, 271-284.
12. *Лягин И.В., Ефременко Е.Н., Кабанов А.В.* (2014) Вестн. Моск. Ун-та. Сер. 2: Химия, **55**(3), 167-173.
13. *Lyagin I.V., Andrianova M.S., Efremenko E.N.* (2016) Applied Microbiol. Biotechnol., **100**(13), 5829-5838.
14. *Maslova O.V., Stepanov N.A., Grigoryeva A.I., Bruyako M.G, Efremenko E.N.* (2016) Int. J. Pharm. Tech., **8**(4), 27317-27333.
15. *Senko O.V., Maslova O.V., Efremenko E.N.* (2017) Int. J. Environ. Res. Public Health, **14**, 1438..
16. *Кабанов А.В., Клячко Н.Л., Ефременко Е.Н., Лягин И.В.* (2016) Патент РФ на изобретение 2575627. Опубликовано 27.03. 2014 в Бюлл. изобретений №9.
17. *Кабанов А.В., Ефременко Е.Н., Клячко Н.Л., Бронич Т.К.. Лягин И.В., Варфоломеев С.Д.* (2014) Патент РФ на изобретение 2525658. Опубликовано 20.02.2016 в Бюлл. изобретений №5.
18. *Ellman G.L., Courtney K.D., Andres. V., Featherstone R.M.* (1961) Biochem. Pharmacol., **7**(2), 88-95.

19. *Efremenko E., Lyagin I., Gudkov D., Varfolomeyev S*. (2007) Biocatal. Biotransformation, **25**(2-4), 359-364.
20. *Старостина В.К., Дегтева С.А.* (2008) Холинэстераза: методы анализа и диагностическое значение, ЗАО "Вектор-Бест".– Новосибирск : "Вектор-Бест", 35 с.
21. *Singh B.K., Walker A*. (2006) FEMS Microbiol. Rev., **30**, 428-471.
22. *Armbrust K.L*. (2001) Pest Manag Sci., **57**(9), 797-802.

Поступила: 04. 09. 2017.
Принята к печати: 17. 10. 2017.

THE INFLUENCE OF ENZYMATIC REMOVAL OF CHLORPYRIFOS FROM FEED GRAIN-MIXTURE ON THE BIOCHEMICAL PARAMETERS OF RAT BLOOD

O.V. Maslova, O.V. Senko, E.N. Efremenko

Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry,
1/3 Leninskiye Gory, Moscow, 119991 Russia; e-mail: elena_efremenko@list.ru

Organophosphorus pesticides (OP) are used to protect crops from pests. Treatment of plants and animals with pesticides can be done during their growth or creation of conditions necessary for the long-shelf life of the agricultural products. Currently, there are many remedies for prevention and removal of intoxication consequences developed under the action of OP in living organisms. The development of biologics for the degradation of OP and biotechnologies for their application in agriculture is relevant. New biologics based on the stabilized forms of such enzyme as hexahistidine-tagged organophosphorus hydrolase (His_6-OPH) in the form of nano-sized particles were tried for OP detoxification. These biologics (enzyme-polyelectrolyte complexes, EPC) were obtained in accordance to previously developed procedure by mixing solutions of His_6-OPH and polyanion under certain conditions. The main purpose of this work was to evaluate the usage efficiency of EPC based on His_6-OPH and polyglutamic acid for OP detoxification by analyzing biochemical blood parameters of rats consumed the grain-mixture containing chlorpyrifos. The experiment was conducted using female Sprague Dawley albino rats. Treatment of feeding grain-mixture initially containing chlopyrifos (48 mg/kg of the mixture) with EPC based on His_6-OPH (1000 U/kg of the mixture) for 24 h was the most effective. The results showed that rats from the group consuming food after enzymatic removal of chlorpyrifos, had comparable acetyl cholinesterase activity in blood of rats consuming pure food (without any OP intoxication).

Key words: hexahistidine-tagged organophosphorus hydrolase, organophosphorus pesticides, hydrolysis, biochemical blood analysis