

И.В. Кудяева, Л.Б. Маснавиева, Л.А. Бударина

**ОТВЕТНАЯ РЕАКЦИЯ СИСТЕМЫ АНТИОКСИДАНТНЫХ ХЕЛАТОРОВ
У РАБОТАЮЩИХ В ДИНАМИКЕ ХРОНИЧЕСКОЙ ЭКСПОЗИЦИИ
ПРОМЫШЛЕННЫМИ ТОКСИКАНТАМИ****ФГБУ «Восточно-Сибирский научный центр экологии человека» СО РАМН (Иркутск)**

Цель: изучить изменения содержания антиоксидантов-хелаторов в динамике обследования у лиц, экспонированных токсическими веществами. Проведено когортное (с интервалом в 4 года) обследование работающих в контакте с парами металлической ртути, винилхлоридом (ВХ) и эпихлоргидрином (ЭХГ). Все работающие были разделены на группы в зависимости от стажа на момент первого обследования. Были изучены содержание церулоплазмينا (ЦП), мочевой кислоты (МК) и активности супероксиддисмутазы (СОД) в крови. Статистическую обработку результатов осуществляли при помощи пакета прикладных программ «Statistica 6.0».

Установлено, что компенсаторные механизмы ответной реакции со стороны антиоксидантов-хелаторов при воздействии ртути и хлорсодержащих соединений различны. Контакт с ртутью приводит к повышению уровня ЦП на фоне снижения активности СОД и имеет устойчивый характер во времени после 5 лет работы с токсикантом. При экспозиции ВХ аналогичные компенсаторные изменения начинаются после 10 лет производственного стажа и сохраняются на протяжении последующих 5 лет работы. Дальнейший контакт с данным токсикантом приводит к декомпенсированным изменениям со стороны системы СОД-ЦП. Хроническое воздействие ЭХГ сопровождается увеличением уровня МК, приобретающем патогенетический характер у 25 % лиц, отработавших более 10 лет, и повышением активности СОД при стаже более 15 лет. Полученные результаты позволяют сделать заключение о необходимости проведения своевременных профилактических мероприятий у данных лиц. Однако, направленность и период их инициации различны. В случае экспозиции ртутью необходимость в применении антиоксидантов (аскорбиновая кислота, ненасыщенные жирные кислоты) возникает уже через 5 лет контакта с токсикантом. При экспозиции ВХ аналогичные меры следует начинать через 10 лет работы. При этом применение витамина С является нецелесообразным. Работающим в контакте с ЭХГ, напротив, показано профилактическое применение данного антиоксиданта, начиная с 10 лет производственного стажа.

Ключевые слова: антиоксиданты, супероксиддисмутаза, церулоплазмин, мочевая кислота, ртуть, винилхлорид, эпихлоргидрин, компенсаторные реакции

**SYSTEM RESPONSIVENESS OF ANTIOXIDANT CHELATORS IN EMPLOYEES
IN DYNAMICS OF CHRONIC EXPOSURE TO INDUSTRIAL TOXICANTS**

I.V. Kudayeva, L.B. Masnavieva, L.A. Budarina

East-Siberian Scientific Center of Human Ecology SB RAMS, Irkutsk

Purpose: to study the content changes of the antioxidants-chelators in dynamics of examining the persons exposed to the toxic substances. The cohort examination (with the interval of 4 years) of the employees exposed to the metallic mercury vapours, vinyl chloride (VC) and epichlorohydrin (EPCH) has been performed. All the employees were divided into groups in dependence on the working period at the moment of the first examination. The content of ceruloplasmin (CP), the uric acid (UA) and the activity of superoxide dismutase (SOD) in the blood have been studied. Statistical processing the results was performed using the packet of applied programs "Statistica 6.0". The compensatory mechanisms of the responses were found to be different for the antioxidants-chelators in exposure to mercury and chlorine-bearing compounds. The exposure to mercury may promote the increase in the level of CP at the background of the decrease in the activity of SOD and have the stable character in time after 5 years of work and exposure to toxicant. In exposure to VC the analogous compensatory changes were found to begin after 10 years of production working careere and keep for the following 5 years of work. The further exposure to this toxicant may lead to the de-compensatory changes in the system of SOD-CP. The chronic exposure to EPCH may be followed by the increase in the level of UA, acquiring the pathogenetic character in 25 % of persons worked more than 10 years and the increase in the activity of SOD for the working period more than 15 years. The findings allow to conclude about the necessity of performing the timely preventive measures for the persons above. However, the trend and the time period of their initiation may be different. In the case of exposure to mercury the necessity of using the antioxidants (ascorbic acid, unsaturated fatty acids) may arise already after 5 years of exposure to the toxicant. In exposure to vinyl chloride the analogous measures have to begin after 10 years of work. There to, using vitamin C is considered as purposeless. On the contrary, the preventive use of this antioxidant, beginning from 10 years of the production working period, is indicated for the employees exposed to epichlorohydrin.

Key words: antioxidants, superoxide dismutase, ceruloplasmin, uric acid, mercury, vinyl chloride, epichlorohydrin, compensatory responses

Система антиоксидантов является важной составной частью защитных систем организма и включает в себя полифункциональные соединения, которые в зависимости от механизма действия подразделяются на антирадикальные ингибиторы, взаимодействующие с органическими радикалами;

антиокислители, разрушающие перекиси; тушители, инактивирующие возбужденное состояние молекул и хелаторы, связывающие катализаторы окисления (ионы металлов) [1].

К последней из перечисленных групп относится СОД, ферритин, трансферрин, церулоплазмин (ЦП),

молочная и мочевая кислота (МК) [2]. Церулоплазмин входит в состав фракции альфа2-глобулинов и выступает в качестве донора меди для включения ее в белки, например, СОД. В совокупности с трансферрином он образует антиоксидантную систему, регулирующую концентрацию Fe^{2+} . Мочевая кислота является эффективным хелатором ионов железа и меди. Она способна ингибировать $ONOO^-$, O_2^- , синглетный кислород и гидроксильный радикал. СОД, содержащая атомы меди и цинка ускоряет реакцию дисмутации O_2^- в H_2O_2 . Полагают, что атомы цинка в ее составе служат для стабилизации белковой молекулы, а атомы меди непосредственно участвуют в катализе [2].

С оксидативным стрессом связывают один из основных и наиболее общих механизмов токсичности химических соединений [14]. В частности, действие тяжелых металлов активирует во всех живых организмах универсальный механизм защиты, действующий в условиях стрессовой реакции, который включает ряд процессов для лучшей адаптации к неблагоприятным условиям [13], включая оксидативный стресс, реакцию с внутри- и внеклеточными тиолами и интерференцию основных металлов [12]. Среди механизмов токсического воздействия ртути известна замена эссенциальных металлов в металл-содержащих комплексах (гем-содержащие белки и ферменты), приводящая к потере последними биологической активности. Другими веществами, вызывающими активацию оксидативного стресса, являются хлорорганические соединения (винилхлорид (ВХ), эпихлоргидрин (ЭХГ), дихлорэтан, хлористый аллил и др.

Ранее проведенными исследованиями было показано, что все вышеперечисленные токсиканты вызывают изменения процессов перекисного окисления липидов и содержание антиоксидантов в зависимости от стажа работы в контакте с ними [4, 6]. В то же время в литературе отсутствуют сведения, касающиеся того, насколько данные изменения являются стабильными во времени и могут требовать проведения профилактических мероприятий.

В связи с этим, **целью** данной работы явилось изучение изменений содержания антиоксидантов-хелаторов в динамике у лиц, экспонированных токсическими веществами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведено когортное (с интервалом в 4 года) обследование лиц, работающих в контакте с химическими веществами: парами металлической ртути, ВХ и ЭХГ. Все работающие были разделены на группы в зависимости от стажа на момент первого обследования: I – 5–9 лет, II – 10–15 лет, III – 15 лет и более. У лиц данных групп дважды изучали содержание антиоксидантов, содержащих металлы переменной валентности.

Активность СОД в цельной крови оценивали спектрофотометрическим методом по степени торможению аутоокисления адреналина в Na-карбонатном буфере при pH = 10,2, как было описано ранее [6]. Определение ЦП в сыворотке крови осуществлялось

по конечной точке при 37 °C и длине волны 340 нм имунотурбидиметрическим методом, основанном на специфическом взаимодействии между поликлональными антителами к церулоплазмину антисыворотки и соответствующим антигеном при оптимальном pH (7,5) в присутствии полиэтиленгликоля («Sentinel», Италия). Определение МК проводили по конечной точке при помощи тест-набора («Human», Германия), основанном на ее взаимодействии с уриказой. Измерение осуществляли при температуре 37 °C и длине волны 520 нм на биохимическом фотометре («Cormamulty», Польша).

Статистическую обработку результатов осуществляли при помощи пакета прикладных программ «Statistica 6.0». После анализа соответствия изучаемых показателей закону о нормальном распределении (тест Шапиро-Уилка) для попарного сравнения количественных показателей использовали непараметрический метод Вилкоксона. Результаты исследований представлены в виде Med (LQ-UQ). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение содержания изучаемых антиоксидантов у лиц, работающих в контакте с металлической ртутью, позволило установить, что при стаже работы от 5 до 9 лет активность СОД и уровень МК снижались, а содержание ЦП повышалось (табл. 1). При стажевой нагрузке более 10 лет (группы II и III) сохранялось снижение активности СОД и повышение уровня ЦП в динамике обследования. В то же время содержание МК у лиц данных групп не изменялось во времени. Оценка изучаемых показателей у работающих, экспонированных ВХ, при стаже работы менее 10 лет не выявила изменений содержания хелаторов в динамике исследования. У лиц, отработавших во вредных условиях 10–15 лет, отмечалось снижение активности СОД и повышение уровня ЦП. Антиоксидантный статус работников данного производства III стажевой группы в сравнении с динамикой показателей предыдущей когорты характеризовался статистически значимым снижением активности СОД без изменения уровня двух других показателей.

У лиц, контактирующих в процессе производственной деятельности с ЭХГ, на первое место по выявляемости изменений изучаемых показателей вышло повышение уровня МК в динамике обследования, отмечаемое во всех стажевых группах. Что касается активности СОД, было установлено, что в отличие от двух других токсикантов, ЭХГ вызывал статистически значимое ее повышение в динамике обследования у лиц III стажевой группы.

В обсуждении полученных результатов следует отметить следующее. Основными молекулярными мишенями для ионов ртути служат гем-содержащие белки, ферменты, участвующие в процессах конъюгации, системы перекисного и свободно-радикального окисления липидов и белков и антиоксидантной защиты; ферменты транспорта электронов и синтеза АТФ; рецепторные белки и ионные каналы клеточных мембран [10]. Связываясь с SH-группами

Таблица 1

Изменение содержания и активности антиоксидантов в динамике обследования лиц, экспонированных токсическими веществами

Токсикант	Стажевая группа	Супероксиддисмутаза, Ед/мг Нб		Мочевая кислота, ммоль/л		Церулоплазмин, мг/дл	
		1-е исследование	2-е исследование	1-е исследование	2-е исследование	1-е исследование	2-е исследование
Ртуть	I	14,2 (12,0–16,0)	11,2 (9,9–12,0)*	324 (277–354)	285 (239–339)*	27,0 (24,2–29,0)	39,2 (34,0–43,2)*
	II	17,3 (14,2–23,7)	10,8 (9,8–11,1)*	313 (292–339)	265 (231–340)	24,9 (21,0–29,2)	40,8 (34,7–48,3)*
	III	13,4 (11,7–17,2)	10,3 (8,8–11,3)*	318 (311–358)	321 (231–381)	25,7 (22,4–27,3)	40,5 (38,5–52,2)*
Винил-хлорид	I	11,0 (9,9–12,1)	10,3 (9,6–11,0)*	319 (288–374)	326 (282–398)	31,5 (27,9–35,2)	34,1 (29,2–38,9)
	II	11,3 (9,9–12,5)	10,3 (9,4–11,2)*	333 (256–382)	384 (339–454)	28,9 (26,1–34,5)	34,2 (30,0–39,4)*
	III	11,0 (10,6–12,1)	10,4 (9,8–11,5)*	302 (263–357)	327 (301–398)	32,7 (28,2–38,3)	33,9 (29,7–41,0)
Эпихлоргидрин	I	8,7 (7,1–11,9)	10,1 (9,1–11,7)*	247 (220–288)	362 (311–394)*	37,5 (34,2–41,3)	39,8 (36,6–42,3)
	II	9,4 (7,8–11,2)	10,9 (9,4–12,7)*	273 (228–343)	361 (320–448)*	38,7 (34,5–44,7)	40,2 (37,8–42,6)
	III	9,0 (8,2–11,7)	10,8 (9,2–12,6)*	289 (244–349)	384 (349–415)*	38,3 (35,5–45,1)	40,5 (36,0–43,8)

Примечания: * – различия статистически значимы по сравнению с первым исследованием, $p < 0,05$.

белковых молекул, токсикант приводит к нарушению их конформации и инактивации ферментативной активности [10], а его способность вытеснять металлы из металлосодержащих комплексов вызывает потерю их биологической активности [3]. В свою очередь, избыточное наличие металлов переменной валентности усиливает образование кислородных радикалов из перекисей. Чаще всего в данных реакциях проявляют себя ионы железа и меди. Хелаторы, связывая их, снижают активность вышеуказанных процессов, оказывая антиоксидантное действие [2].

Токсичность хлорорганических соединений не связана с их прямым воздействием на металлы, содержащиеся в антиоксидантах, белках и ферментативных системах. Попадание их в организм и метаболические превращения вызывают наработку и секрецию клетками ретикулоэндотелиальной системы активных форм кислорода, что представляет собой этап системного воспалительного ответа, характеризующийся накоплением вторичных продуктов перекисного окисления [7], для инактивации которых важное значение имеют антиоксиданты, в том числе, из группы хелаторов. Если система противовоспалительной защиты переходит в стадию компенсации, происходит активация синтеза клетками антиокислительных ферментов (СОД и глутатионпероксидаза). В наших исследованиях мы установили увеличение активности СОД в динамике обследования у лиц, экспонированных ЭХГ со стажем работы более 15 лет, что можно рассматривать в качестве компенсаторной реакции организма. В то же время, полученные результаты, касающиеся снижения активности данного фермента у работающих в контакте с ртутью, согласуются с данными других исследователей [11] и подтверждают полученные ранее результаты поперечного исследования системы ПОЛ – АОС в различных стажевых группах, которые выявили снижение активности данного антиоксиданта с увеличением стажевой нагрузки [4, 6].

Второй из изученных нами антиоксидантов – ЦП обладает способностью окислять ионы Fe^{2+} и ингибировать гидроксильные радикалы. Взаимодействуя с O_2^- , он проявляет СОД-подобную активность. Поэтому при патологических состояниях, сопровождающихся снижением активности СОД, уровень ЦП в крови может компенсаторно увеличиваться [2]. Скорей всего, наблюдаемое нами повышение ЦП на фоне сниженной активности СОД у лиц, контактирующих с ртутью (на всем протяжении экспозиционного периода), и у работающих в контакте с ВХ 10–15 лет является компенсаторным механизмом антиоксидантной защиты. При этом не следует забывать, что ЦП обладает и прооксидантным действием – усиливает окисление аскорбиновой кислоты, катехоламинов, серотонина и соединений, содержащих SH-группы с образованием перекиси водорода в этих реакциях [2]. В связи с этим, повышенное содержание ЦП (выше 100 мкг/мл) может оказывать стимулирующее действие на развитие оксидативного стресса за счет, прежде всего, окисления липопропротеидов низкой плотности. Однако среди обследуемых лиц с аналогичной концентрацией ЦП не встречались.

Несмотря на то, что ВХ и ЭХГ относятся к группе хлорорганических соединений, точки приложения их воздействия на антиоксидантную систему различались. При воздействии ЭХГ у работающих, в первую очередь, отмечено повышение МК. Известно, что данный антиоксидант способен ингибировать O_2^- , OH-радикалы, ONOO⁻, гемовые оксиданты, а за счет аминогрупп связывать ионы металлов переменной валентности, образуя стабильные комплексы. За счет высокого содержания МК сыворотке крови, на нее приходится от 35 до 65 % защиты липопропротеидов от окисления, 10–15 % ингибирования гидроксил-радикала и синглетного кислорода [2]. Следовательно, повышение уровня МК в динамике обследования на фоне неизменного содержания ЦП и активности СОД (или повышения последней) у лиц, подверженных воздействию ЭХГ, свидетельствуют об активации антиоксидантной защиты. В то же время, необходимо

отметить, что 25 % обследуемых со стажем работы в условиях действия ЭХГ более 10 лет имели ко второму обследованию концентрацию МК в сыворотке крови, превышающую верхнюю референсную границу (420 ммоль/л). Данный факт следует рассматривать как следствие усиления катаболизма эндогенных пуринов или эндогенной деструкции клеток (ДНК, РНК, АТФ), нарушения биологической функции эндоэкологии и формирования реакции воспаления [9]. При этом можно говорить о риске развития у данных индивидуумов сердечно-сосудистой патологии в виде артериальной гипертонии и атеросклероза, а также формирования синдрома резистентности к инсулину. Данное утверждение основано на установленной положительной корреляции гиперурикемии с уровнем артериального давления, патологией почек, симптомами метаболического синдрома и повышения в крови уровня триглицеридов [8, 9]. Необходимо сказать, что увеличение в динамике концентрации последних за пределы референсных значений более чем у 30–40 % обследуемых зарегистрировано при воздействии ртути и ВХ (для ЭХГ аналогичных исследований выполнено не было) [5, 7]. Следует отметить, что экзогенным антиоксидантом, способным инактивировать гидрофильные активные формы кислорода, является аскорбиновая кислота, введение которой позволяет на первоначальных этапах развития гиперурикемии снизить уровень МК, не снижая при этом эффективность антиоксидантной защиты [9].

Полученные результаты позволяют сделать заключение о необходимости проведения своевременных профилактических мероприятий у работающих в контакте с ртутью, ВХ и ЭХГ. Однако, направленность и период их инициации различны. В случае экспозиции ртутью необходимость в применении антиоксидантов возникает уже через 5 лет контакта с токсикантом и требует комплексного подхода с применением как гидрофильного захватчика активных форм кислорода (аскорбиновой кислоты), так и липофильных соединений (ненасыщенных жирных кислот), проводить исследования на содержание в крови железа, гемсодержащих белков и меди. При экспозиции ВХ аналогичные исследования и профилактические мероприятия следует начинать через 10 лет работы. При этом применение витамина С является нецелесообразным. Работающим в контакте с ЭХГ, напротив, показано профилактическое применение данного антиоксиданта, начиная с 10 лет производственного стажа.

ВЫВОД

Таким образом, компенсаторные механизмы ответной реакции со стороны антиоксидантов-хелаторов при воздействии ртути и хлорсодержащих соединений различны. Контакт с ртутью приводит, прежде всего, к повышению уровня церулоплазмينا на фоне снижения активности СОД и имеет устойчивый характер во времени после 5 лет работы с токсикантом. При экспозиции ВХ аналогичные компенсаторные изменения начинаются после 10 лет производственного стажа и сохраняются на про-

тяжении последующих 5 лет работы. Дальнейший контакт с данным токсикантом приводит к декомпенсированным изменениям со стороны системы СОД-ЦП. Хроническое воздействие ЭХГ сопровождается увеличением уровня МК, приобретающим патогенетический характер у 25 % лиц, отработавших более 10 лет, и повышением активности СОД при стаже более 15 лет.

ЛИТЕРАТУРА

1. Журавлев А.И. Биоантиоксиданты в регуляции метаболизма в норме и патологии. – М., 1982. – С. 3–37.
2. Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньщикова Е.Б. Окислительный стресс. – М.: МАИК «Наука/Интерпериодика», 2001. – 343 с.
3. Исидоров В.А. Введение в химическую эко-токсикологию. Учебное пособие. – СПб.: Химиздат, 1999. – 144 с.
4. Кудалева И.В. Роль оксидативного стресса в патогенезе профессиональных заболеваний, возникших от воздействия токсических веществ // Вестник новых медицинских технологий. – 2009. – № 1. – С. 253.
5. Кудалева И.В., Бударина Л.А. Динамическое исследование липидного обмена у рабочих, контактирующих с ртутью // Фундаментальные исследования. – 2012. – № 5–1. – С. 52–57.
6. Кудалева И.В., Бударина Л.А., Маснавиева Л.Б. Закономерности нарушений биохимических процессов при воздействии нейротоксичных веществ различной природы // Медицина труда и промышленная экология. – 2008. – № 8. – С. 7–11.
7. Кудалева И.В. Роль биохимических процессов при формировании неврологических нарушений у работающих в условиях экспозиции производственными токсикантами: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – Иркутск, 2013. – 47 с.
8. Рожкова Т.А., Амелишина В.А., Яровая Е.Б., Коткина Т.И. и др. Гиперурикемия у пациентов с высоким содержанием триглицеридов. Сочетание генетических, средовых факторов и тактика лечения // Клиническая лабораторная диагностика. – 2012. – № 6. – С. 3–8.
9. Титов В.Н., Ощепкова Е.В., Дмитриев В.А., Гущина О.В. и др. Гиперурикемия – показатель нарушения биологических функций эндоэкологии и адаптации, биологических реакций экскреции, воспаления и артериального давления // Клиническая лабораторная диагностика. – 2012. – № 4. – С. 3–14.
10. Трахтенберг И.М., Иванова Л.А. Современные представления о воздействии ртути на клеточные мембраны // Гигиена и санитария. – 1984. – № 5. – С. 59–63.
11. Bulat P., Dujic I., Potkonjak B., Vidakovic A. Activity of glutathione peroxidase and superoxide dismutase in workers occupationally exposed to mercury // Int. Arch. Occup. Environ. Health. – 1998. – N 71. – P. 37–39.
12. Flora S.J. Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure // Oxid. Med. Cell Longev. – 2009. – Vol. 128, N 4. – P. 191–206.

13. Papp E., Nardai G., Söti C., Csermely P. Molecular chaperones, stress proteins and redox homeostasis // Biofactors. – 2003. – Vol. 17, N 1–4. – P. 249–257.

14. Pinheiro M.C., Macchi B.M., Vieira J.L. et al. Mercury exposure and antioxidant defenses in women: a comparative study in the Amazon // Environmental Research. – 2008. – Vol. 107, N 1. – P. 53–59.

Сведения об авторах

Кудаева Ирина Валерьевна – кандидат медицинских наук, доцент, заведующая клинико-диагностической лаборатории, руководитель лаборатории биохимии Ангарского филиала ФГБУ «Восточно-Сибирский научный центр экологии человека» СО РАМН – Научно-исследовательский институт медицины труда и экологии человека (665827, г. Ангарск, а/я 1170; тел.: 8 (3955) 55-96-63; e-mail: kudaeva_irina@mail.ru)

Маснавиева Людмила Борисовна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биохимии Ангарского филиала ФГБУ «Восточно-Сибирский научный центр экологии человека» СО РАМН – Научно-исследовательский институт медицины труда и экологии человека (665827, г. Ангарск, а/я 1170; тел.: 8 (3955) 55-40-86; e-mail: masnavieva_luda@mail.ru)

Бударина Лидия Александровна – кандидат медицинских наук, врач клинической лабораторной диагностики Ангарского филиала ФГБУ «Восточно-Сибирский научный центр экологии человека» СО РАМН – Научно-исследовательский институт медицины труда и экологии человека (665827, г. Ангарск, а/я 1170; тел.: 8 (3955) 55-96-63)