

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

ПОКАЗАТЕЛИ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ И ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ У ЛИЦ С НЕЙРОИНТОКСИКАЦИЕЙ В ОТДАЛЕННОМ ПЕРИОДЕ**Ангарский филиал ВСНЦ экологии человека СО РАМН – НИИ медицины труда и экологии человека (Ангарск)**

Были исследованы показатели перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы у групп лиц с токсической энцефалопатией, вызванной хроническим воздействием паров металлической ртути или комплексом токсических веществ в отдаленном постконтактном периоде. Установлено, что при токсической энцефалопатии различного генеза изменения показателей перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты имеют свои особенности. У пожарных повышен уровень мочевой кислоты, снижено содержание метаболитов оксида азота. В крови лиц с энцефалопатией, вызванной хроническим воздействием ртути, в отдаленном периоде выявлена повышенная концентрация мочевой кислоты, на фоне понижения активности супероксиддисмутазы и уровня церулоплазмينا.

Ключевые слова: токсическая энцефалопатия, антиоксиданты, перекисное окисление

INDICES OF ANTIOXIDANT PROTECTION AND LIPID PEROXIDATION IN PERSONS WITH NEUROTOXICATION IN LONG-TERM PERIOD AFTER EXPOSURE

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

Institute Occupational Health & Human Ecology ESSC HE SB RAMS, Angarsk

The indices of the lipid peroxidation as well as the antioxidant system have been studied in the persons with toxic encephalopathy induced by chronic exposure to the metallic mercury vapours or a complex of the toxic substances in the long-term period after exposure. The changes in the indices of the lipid peroxidation and the antioxidant protection were found to have their features in the toxics encephalopathy of different genesis. The fire fighters examined have shown a higher level of the uric acid and the reduced metabolite content of nitrogen oxide. A higher concentration of the uric acid was revealed to be in the blood of the persons with encephalopathy induced by the chronic exposure to mercury in the long-term period after exposure on the background of reducing the activity of superoxide dismutase and the ceruloplasmin level.

Key words: toxic encephalopathy, antioxidants, peroxidation

Генерация активных кислородных метаболитов является обязательным атрибутом нормальной аэробной жизни. Около 90 % потребляемого человеком молекулярного кислорода вовлекается в процессы окислительного фосфорилирования с образованием активированных кислородных метаболитов. Свободно радикальные реакции перекисного окисления липидов (ПОЛ) имеют большое значение для обновления липидов мембран клеток и внутриклеточных органелл и поддержания структурного гомеостаза. Постоянное образование свободных радикалов в живых организмах уравновешено их дезактивацией антиоксидантами. Однако, гиперпродукция активных форм кислорода не всегда может быть инактивирована антиоксидантной системой, что оказывает повреждающее воздействие на клеточные мембраны, белки, нуклеиновые кислоты, окисляя остатки метионина, гистидина, цистеина, триптофана. Таким образом, соотношение активности окислительных процессов и антиоксидантной защиты определяет адаптационные возможности организма и риск развития окислительного стресса, который может стать причиной формирования многих патологий, связанных, в первую очередь, с функциональными нарушениями биологических барьеров [4]. Наиболее уязвимыми к деструктивному воздействию активированных кислородных метаболитов явля-

ются клетки и ткани нервной системы, из-за высокой интенсивности процессов окислительного метаболизма и повышенной чувствительности к дыхательным ядам.

Известно, что острое и хроническое воздействие химических веществ, обладающих нейротоксичным действием, может сопровождаться психическими расстройствами и формированием синдрома энцефалопатии [1, 7, 9, 14]. К настоящему времени накоплено большое количество данных о том, что при психоневрологических расстройствах (болезни Альцгеймера и Паркинсона, инсульты, неврозы) наблюдается развитие окислительного стресса в нервной ткани [4, 11]. Одной из причин развития расстройств, вызванных действием нейротоксикантов, могут служить изменения соотношения показателей ПОЛ и антиоксидантной системы. Особый интерес представляет изучение показателей окислительного стресса у лиц, подвергавшихся воздействию нейротоксических веществ в отдаленном периоде интоксикаций. Поскольку выявлено, что у экспонированной ртутью когорты даже после прекращения контакта с токсикантом, органические психические расстройства сохраняются, а нередко наблюдается их нарастание [1].

В связи с вышеизложенным, целью работы явилось исследование изменений показателей перекисного окисления липидов и антиоксидантной

системы и выявление их особенностей в отдаленном постконтактном периоде у лиц с токсической энцефалопатией.

МЕТОДИКА

В клинике НИИ медицины труда и экологии человека были обследованы 36 мужчин в возрасте 38 – 58 лет с установленным диагнозом «хроническая ртутная интоксикация», работавших в производстве каустической соды методом ртутного электролиза (группа 1). Во вторую группу вошли 13 пожарных (41 – 58 лет), участвовавших в тушении пожара, где сгорело несколько сотен тонн кабельных изделий и технологических материалов, которым был установлен диагноз «последствия острой интоксикации комплексом токсических веществ». На момент обследования лица обеих групп не контактировали с токсическими веществами более 5 лет. Контрольную группу составили 45 мужчин в возрасте от 39 до 60 лет, не имеющие в профессиональном маршруте контакта с химическими веществами. Изучение биохимических показателей осуществляли в крови, взятой из локтевой вены после 12-часового голодания. Содержание церулоплазмينا, мочевого кислоты, общего холестерина (ХС) и холестерина в липопротеидах высокой плотности (ХС ЛПВП) в сыворотке крови определяли ферментативными методами с помощью тест-наборов «Human» (Германия), «Cormay» (Польша) на биохимическом анализаторе «Cormay multy». Концентрацию восстановленного глутатиона (ВГ) в крови оценивали спектрофотометрически при помощи дитионитробензойной кислоты [15]. Активность супероксиддисмутазы в цельной крови определяли по степени торможения аутоокисления адреналина в щелочной среде [13]. Уровень оксида азота в сыворотке крови оценивали по суммарному количеству его стабильных метаболитов – нитрита и нитрата (NO_x) с использованием реактива Грисса спектрофотометрическим методом [3]. Интегральным показателем активности процессов перекисного окисления липидов служили соединения, реагирующие с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-АП), содержание которых измеряли колориметрическим методом при взаимодействии малонового альдегида с тиобарбитуровой кислотой [16].

Статистическую обработку результатов осуществляли при помощи пакета прикладных программ «Statistica 6.0». После анализа соответствия изучаемых показателей закону о нормальном распределении (тест Шапиро-Уилка) был использован тест Краскела-Уоллиса, с последующим попарным сравнением количественных показателей по U-критерию Манна-Уитни [10]. Различия считали статистически значимыми для дисперсионного анализа при $p < 0,05$, при попарном сравнении учитывали поправку Бонферрони – критический уровень значимости оставался 0,016. Результаты исследований представлены в таблицах в виде медианы, верхнего и нижнего квартилей, по тексту – медианы и стандартного отклонения.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Сравнительный анализ полученных данных (табл. 1) выявил, что активность супероксиддисмутазы у лиц с диагнозом хронической ртутной интоксикации ($9,52 \pm 1,99$ Ед/мг Нb) была ниже значений как контрольной группы ($10,21 \pm 1,00$ Ед/мг Нb, $p = 0,031$), так и группы пожарных ($11,91 \pm 3,99$ Ед/мг Нb, $p = 0,047$). Обращает на себя внимание разнонаправленность изменений активности фермента у больных токсической энцефалопатией, вызванной интоксикацией различными веществами (ртутью и комплексом токсических веществ) по отношению к контролю, при этом у лиц с хронической ртутной интоксикацией данный показатель ниже в 1,25 раза в сравнении со значениями у пожарных. Содержание церулоплазмينا у обследованных пациентов обеих групп достоверно не отличалось от контрольных величин ($36,95 \pm 4,47$ мг/дл, $p = 0,076$ и $p = 0,120$ для 1 и 2 групп соответственно). Следует отметить, что уровень данного анализата, у рабочих с интоксикацией ртутью был ниже ($34,10 \pm 7,33$ мг/дл), чем в группе пожарных ($38,10 \pm 9,60$ мг/дл, $p = 0,019$). Содержание мочевого кислоты в сыворотке крови как у рабочих с ртутной интоксикацией, так и у пожарных было достоверно выше контрольных величин ($258,0 \pm 45,5$ мкм/л) и составило $312,0 \pm 93,4$ мкм/л ($p = 0,015$) и $340,5 \pm 77,2$ мкм/л ($p = 0,001$) соответственно. Изменения уровня мочевого кислоты в 1 и 2 группах имели одинаковую направленность и не зависели от вида воздействующего фактора, поэтому межгрупповых различий в содержании данного анализата выявлено не было ($p = 0,150$). Анализ содержания восстановленного глутатиона показал незначительное снижение его уровня в крови лиц как с хронической ртутной интоксикацией ($0,91 \pm 0,38$ мкм/мл), так и с последствиями острой интоксикации комплексом токсических веществ ($0,93 \pm 0,22$ мкм/мл), по сравнению с контрольными значениями ($1,01 \pm 0,38$ мкм/мл), которое, однако, не являлось статистически значимым. Известно, что снижение уровня восстановленного глутатиона является маркером воздействия токсикантов, которые связывают белковые и небелковые SH-группы [2, 11, 12]. Поскольку данные процессы носят обратимый характер, то после прекращения контакта, возможно восстановление функциональной активности антиоксидантной защиты. Подтверждением наших предположений может служить динамическое изменение уровня восстановленного глутатиона в крови у лиц, подвергающихся влиянию паров металлической ртути [5, 8]. При изучении уровня оксида азота у лиц первой группы ($37,62 \pm 12,78$ мкм/л) статистически значимых различий по сравнению с контрольными величинами ($38,92 \pm 11,48$ мкм/л) не обнаружено ($p = 0,982$). У пожарных с последствиями острой интоксикации комплексом токсических веществ выявлена лишь тенденция к снижению его содержания ($24,63 \pm 13,21$ мкм/л) по сравнению с контролем ($p = 0,071$). Обращает на себя внимание факт снижения уровня метаболитов оксида азота

более чем на 40 % у пожарных по сравнению с таковым у лиц с установленным диагнозом хронической ртутной интоксикации.

Еще одним показателем, косвенно характеризующим активность антиоксидантной защиты, может служить уровень ХС ЛПВП. Исследование данного анализа у лиц, экспонированных ртутью выявило его незначительное снижение ($0,97 \pm 0,39$ ммоль/л) по сравнению с контролем ($1,15 \pm 0,29$ ммоль/л, $p = 0,041$). Изменение уровня ХС ЛПВП у пожарных имело ту же направленность ($0,93 \pm 0,32$ ммоль/л), но не являлось статистически значимым ($p = 0,146$). Снижение фракции ХС ЛПВП в сыворотке крови обследованных наблюдалось на фоне повышенного уровня общего холестерина ($5,26 \pm 1,20$ ммоль/л, $p = 0,021$ и $5,11 \pm 1,48$ ммоль/л, $p = 0,033$ для 1 и 2 групп соответственно) по сравнению с контрольными значениями ($4,66 \pm 0,84$ ммоль/л). Содержание вторичных продуктов перекисного окисления липидов — ТБК-АП в сыворотке крови обследуемых достоверно не отличалось от контрольных значений ($3,59 \pm 2,37$ мкм/л) и составило для лиц с хронической ртутной интоксикацией $3,90 \pm 3,01$ мкм/л ($p = 0,886$) и $4,05 \pm 1,07$ мкм/л ($p = 0,845$) — для пожарных.

Выявленные нарушения антиоксидантной защиты могут быть следствием воздействия токсических веществ, приводящих к разобщению процессов дыхания и фосфорилирования. При этом происходит избыточное образование активированных кислородных метаболитов, в инактивации которых, в частности, супероксидного анион-радикала, принимают участие супероксиддисмутаза и церулоплазмин. Дальнейшую утилизацию перекиси водорода осуществляет глутатион-пероксидаза, для которой субстратом является восстановленный глутатион. Так же за молекулы кислорода конкурируют мочевая кислота и NO-синтаза, использующая кислород для синтеза оксида азота, способные ингибировать гидроксил-радикал, супероксидный анион-радикал и синглетный кислород [4].

Воздействие любых повреждающих факторов сначала вызывает компенсаторное повышение активности антиоксидантной защиты на фоне неизменных показателей перекисного окисления липидов, а затем ее снижение на фоне накопления продуктов перекисного окисления липидов. Можно предположить, что при разобщении контакта с токсикантами будет наблюдаться восстановление функциональной активности антиоксидантной системы. Однако, в результате проведенных нами исследований, выявлено снижение активности таких антиоксидантов как супероксиддисмутаза и церулоплазмин на фоне повышенного содержания мочевой кислоты у группы лиц, контактировавших с ртутью. Дополнительным свидетельством наличия оксидативного стресса может служить снижение уровня ХС ЛПВП. Поскольку при воздействии активированных кислородных метаболитов происходит окислительная модификация липопротеинов [6]. Следовательно, у пациентов с хронической ртутной интоксикацией даже после прекращения контакта с ртутью активность антиоксидантной защиты снижена, что объясняется способностью выхода кумулированной ртути из депо в кровяное русло и продолжением токсического воздействия уже после выхода из профессии.

У пожарных, подвергшихся воздействию продуктов горения, напротив, выявлены повышения уровня мочевой кислоты, незначительно содержания церулоплазмينا и активности супероксиддисмутаза, которые могут свидетельствовать о напряжении антиоксидантной защиты. Обращает на себя внимание тот факт, что у данных лиц уровень оксида азота в крови значительно снижен. Одной из причин этого процесса может быть снижение его синтеза конститутивной NO-синтазой, зависящей от концентрации клеточного кальция. Данное предположение косвенно подтверждается повышением активности супероксиддисмутаза, вызывающим увеличение клеточного уровня кальция, а, следовательно, и активности конститутивной

Таблица 1

Показатели антиоксидантной защиты и перекисного окисления липидов у лиц в отдаленном периоде интоксикации токсическими веществами различной природы Med (LQ–UQ)

Показатель, ед. изм.	Группа 1 (n = 36)	Группа 2 (n = 13)	Контрольная группа (n = 45)	$P_{\text{дисп}}$
Восстановленный глутатион, мкм/мл	0,91 (0,76–1,15)	0,93 (0,85–1,01)	1,01 (0,87–1,09)	0,273
Супероксиддисмутаза, Ед/мг Нб	9,52 (8,38–10,43)	11,91 (10,70–13,16) ^у	10,21 (9,69–10,76) ^у	0,011
Церулоплазмин, мг/дл	34,10 (29,10–37,70) [#]	38,10 (34,30–45,55) ^х	36,95 (32,65–39,75)	0,028
Мочевая кислота, мкм/л	312,0 (245,0–366,0) [*]	340,5 (280,0–413,5) [*]	258,0 (239,0–298,0)	0,002
Метаболиты оксида азота, мкм/л	38,92 (29,59–42,42)	24,63 (21,28–42,27) ^{#х}	37,62 (27,94–43,12)	0,153
Общий холестерин, мм/л	5,26 (4,56–6,02) [#]	5,11 (4,44–6,51) [#]	4,66 (4,09–5,13)	0,027
ХС ЛПВП, мм/л	0,97 (0,83–1,18) [#]	0,93 (0,84–1,21)	1,15 (0,93–1,30)	0,095
ТБК-активные продукты, мкм/л	3,90 (2,82–5,08)	4,05 (3,14–4,71)	3,59 (3,08–4,82)	0,975

Примечания: $p_{\text{дисп}}$ – ANOVA между группами 1, 2, контроль; * – различия статистически значимы ($p < 0,016$) по сравнению с контролем, ^у – различия статистически значимы ($p < 0,016$) по сравнению с группой 1, [#] – тенденция к наличию различий ($p < 0,1$) по сравнению с контролем, ^х – тенденция к наличию различий ($p < 0,1$) по сравнению с группой 1.

изоформы синтазы. При исследованиях реактивности церебральной гемодинамики ранее было выявлено, что тонус мозговых сосудов повышен и затруднен венозный отток [1, 9]. Т.к. оксид азота является сильным вазодилататором, можно предположить, что его снижение влечет за собой еще большее повышение тонуса сосудов и усугубление патологических процессов.

ВЫВОДЫ

1. Изменения показателей перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы у лиц с токсической энцефалопатией различного генеза в отдаленном постконтактном периоде имеют свои особенности. У пожарных отмечено напряжение антиоксидантной системы за счет повышения содержания мочевой кислоты. Для данной когорты характерно снижение уровня оксида азота, которое может играть немаловажную роль в процессах нарушения гемодинамики мозга.

2. При токсической энцефалопатии, вызванной хроническим воздействием ртути, выявлено повышенное содержание мочевой кислоты на фоне снижения активности супероксиддисмутазы и уровня церулоплазмينا, что может свидетельствовать о развитии окислительного стресса у данных лиц.

3. Учитывая клинические данные о состоянии здоровья пациентов из описанных групп, существует необходимость экспериментальных исследований, направленных на изучение показателей оксидативного стресса не только в крови, как косвенного отражения процессов протекающих в ЦНС, но и в ткани головного мозга.

ЛИТЕРАТУРА

1. Андреева О.К., Колесов В.Г., Лахман О.Л. Поражение нервной системы в отдаленном периоде хронической ртутной интоксикации // Бюлл. ВСНЦ СО РАМН. — 2002. — № 3. — С. 72–75.
2. Бударина Л.А., Кудалева И.В. Основные закономерности изменений биохимических показателей у пожарных // Мат. межд. научно-практической конференции, Одесса, 1–5 июня, 2007 г. — Одесса, 2007. — Т. 15. — С. 63–67.
3. Голиков П.П., Николаева Н.Ю. Метод определения нитрита/нитрата (NOx) в сыворотке крови // Биомедицинская химия. — 2004. — №. 1. — С. 79–85.

Сведения об авторах

Маснавијева Людмила Борисовна — к.б.н., научный сотрудник биохимической лаборатории Ангарского филиала ВСНЦ ЭЧ СО РАМН (665827, г. Ангарск, а/я 1170; тел.: 8 (3955) 55-40-86; e-mail: masnavieva_luda@mail.ru)

Бударина Лидия Александровна — к.м.н., врач клинко-диагностической лаборатории Ангарского филиала ВСНЦ ЭЧ СО РАМН (665827, г. Ангарск, а/я 1170; тел.: 8 (3955) 55-90-70, 55-40-72; e-mail: imt@irmail.ru)

Кудалева Ирина Валерьевна — к.м.н., зав. клинко-диагностической лабораторией Ангарского филиала ВСНЦ ЭЧ СО РАМН (665827, г. Ангарск, а/я 1170; тел.: 8 (3955) 55-90-70, 55-40-72; e-mail: imt@irmail.ru)

4. Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньщикова Е.Б. Окислительный стресс. — М.: МАИК Наука / Интерпериодика, 2001. — 343 с.

5. Измеров Н.Ф. Профессиональные заболевания: Руководство для врачей / под ред. Н.Ф. Измерова. — М.: Медицина, 1996. — Т. 1–2. — 313 с.

6. Климов А.Н., Никульчева Н.Г. Обмен липидов и липопротеидов и его нарушения: руководство для врачей. — СПб.: Питер, 1999. — 505 с.

7. Колесов В.А. и др. Психопатологические проявления отдаленного периода профессиональных нейроинтоксикаций // Журн. неврологии и психиатрии. — 2005. — Т. 105, № 1. — С. 25–29.

8. Кудалева И.В., Маснавијева Л.Б. Влияние химических веществ различной природы на показатели окислительного стресса // Мед. труда и пром. экология. — 2008. — № 1. — С. 17–24.

9. Лахман О.Л. и др. Течение энцефалопатии в отдаленном периоде профессиональной ртутной интоксикации // Мед. труда и пром. экология. — 2003. — № 3. — С. 46–48.

10. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. — М.: Медиа Сфера, 2002. — 312 с.

11. Трахтенберг И.М., Иванова Л.А. Современные представления о воздействии ртути на клеточные мембраны // Гиг. и сан. — 1984. — № 5. — С. 59–63.

12. Трахтенберг И.М. Хроническое воздействие ртути на организм. — Киев: Здоров'я, 1969. — 391 с.

13. Fridovich J., Beauchamp C. Superoxide Dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamid gels // Anal. Biochem. — 1971. — Vol. 44. — P. 276–278.

14. Sakaue M. et al. Acceleration of methylmercury-induced cell death of rat cerebellar neurons by brain-derived neurotrophic factor *in vitro* // Brain Res. — 2009. — Vol. 1273. — P. 155–162.

15. Sedlak J., Lindsay R.H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent // Analyt. Biochem. — 1968. — Vol. 25. — P. 192–205.

16. Uchiyama M., Michara M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test // Analyt. Biochem. — 1978. — Vol. 86, N 1. — P. 271–278.