

**Федеральное государственное унитарное предприятие
«Научно- исследовательский институт гигиены, профпатологии и
экологии человека» Федерального медико-биологического агентства**

ЗНАЧЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ДЕТОКСИКАЦИИ В ОЦЕНКЕ РИСКА ВОЗДЕЙСТВИЯ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИХ ОТРАВЛЯЮЩИХ ВЕЩЕСТВ



В.Р. Рембовский, Л.А. Могиленкова

Актуальность

Фосфорорганические вещества, использовавшиеся в качестве боевых отравляющих веществ (ОВ), до сих пор могут представлять потенциальную опасность для человека на завершающем этапе их уничтожения, в условиях несанкционированного их применения.

При анализе риска влияния ФОВ на здоровье лиц, имеющих контакт с ними, важен выбор критериев эффектов, наблюдаемых у пораженных в условиях аварийных и нештатных ситуаций. Особую сложность представляет прогноз и оценка риска последствий длительного низкоуровневого воздействия ФОВ на показатели здоровья пострадавших, наблюдаемые в отдаленный период.

К перспективным биомаркерам ранних проявлений эффектов ФОВ следует отнести генетико-биохимические и иммунологические показатели, характеризующие процессы защитных механизмов.

.

Acute lethality of organophosphorus nerve agents

	LD ₅₀ (flg/kg)			
	Sarin	Soman	Tabun	VX
Intravenous				
Human	14*		14 (LD _{Lo}) ^c	1.5 (TD _{Lo})"
Rat	45-63"	44.5"	70"	7-10"
Mouse	83"	35"	150"	20"
Guinea pig		27.5"		
Rabbit	15"		63"	
Percutaneous				
Human	24-28* 10 ³ "	18,000 (LD _{Lo})"	14—21 * 10 ³ ^c	86 (LD _{Lo})"
Rat	2,500'		18,000"	
Mouse	1,08<Y	7,800"	1,000"	
Guinea pig	8,750 ^s	9,930 ^s	25,840 ^s	34 ^s
Rabbit	925"		2,500"	
Subcutaneous				
Human				30 (LD _{Lo}) ^c
Rat	103-108"	70-165'	162"	12"
Mouse	170"	156"	250"	22 ^f
Guinea pig	30"	24"	120"	8.4"
Rabbit	30"	20"	375"	14-66'
Respiratory"				
Human	50-100"	70 (LD _{Lo})"	150 (LD _{Lo})"	5-15"
Rat	80-300"		30.4"	
Mouse	240-380"	33.3"	0.5"	
Guinea pig	100-200"		197"	
Rabbit	75-144"			

Патогенез эффектов ФОВ обусловлен, с одной стороны, прямым токсическим действием на органы мишени, с другой – защитной функцией системы детоксикации (рис. 1).

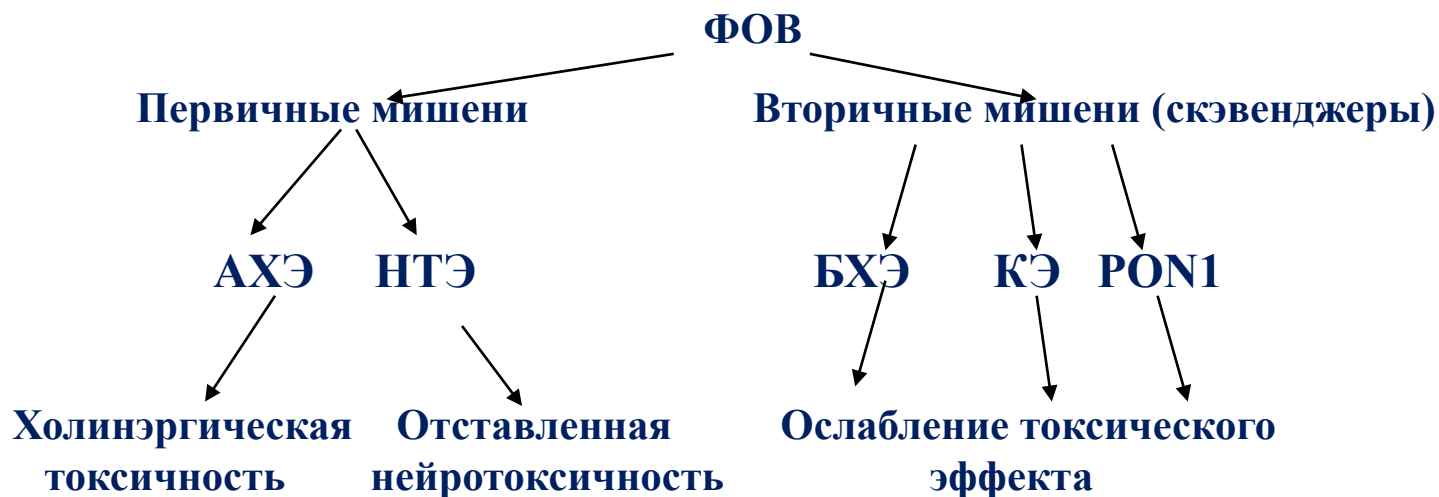


Рис. 1 Мишени воздействия ФОВ

Ацетилхолинэстераза (АХЭ) и нейротоксичная эстераза (НТЭ) являются «первичными» специфическими биомишенями, взаимодействие с которыми обуславливает соответственно острую холинэргическую токсичность и отставленную нейротоксичность ФОВ. Неспецифические эстеразы – бутирилхолинэстераза (БХЭ) и карбоксилэстеразы (КЭ), параоксоназа 1 (PON1) – «вторичные» мишени, которые действуют как стехиометрические скэвенджеры, снижая концентрацию ФОВ.

Catalytic constants for hydrolysis of nerve agents and rate constants of esterase inhibition

			Inhibition rate constant, k_i ($M^{-1} \text{ min}^{-1}$)						k_{cat} (min^{-1}) hr wt
	Bovine AChE	Electric eel AChE	Human AChE	Minipig AChE	Pig AChE	Equine BChE	Human BChE	Rat plasma CarbE	PON1
Soman									
C(±)P(±)-soman	5×10^{7J}	1.5×10^{14}	$9.2 \times 10^{7B/L}$			1.29×10^{7c}	2.8×10^{8b}	0.51×10^{7c}	7500^{13}
C(+)P(+)-soman	$< 1 \times 10^3$	$< 5 \times 10^M$	$2 \times 10^{3*2}$			$1.7 \times 10^{6*}$	6×10^{6A}		1030 ± 94^f
C(-)P(+)-soman	$< 1 \times 10^M$	$< 5 \times 10^M$	$2 \times 10^{3*2}$			1.2×10^{14}			593 ± 54^7
C(+)P(-)-soman	1.75×10^{14}	2.8×10^{14}	$8 \times 10^{7A^{14}}$			1×10^9	5×10^{14}	$3 \times 10^{7/}$	553 ± 163^7
C(—)P(—)-soman	2.7×10^{14}	1.8×10^{14}	$1.5 \times 10^{14*2}$			$6 \times 10^{7*}$	$4 \times 10^{7*}$	$1 \times 10^6/$	501 ± 45^7
Sarin									
(±)-sarin	$1.51 \times 10^{7<}$		$3.2 \times 10^{7*1}$			0.56×10^{70}	$3.2 \times 10^{7/1}$	$0.30 \times 10^{7<}$	
(+)-sarin	$< 3 \times 10^{3i}$								
(—)-sarin	$1.4 \times 10^{7*}$								
Cyclosarin									
(±)-cyclosarin			4.21×10^{14}	4.84×10^{14}	4.84×10^{14}		7.2×10^{14}		$25,400^{13}$
VX									
(±)-VX	$3.23 \times 10^{7^{14}}$		$9.91 \times 10^{7^{14}}$	$5.61 \times 10^{7^{14}}$	$4.43 \times 10^{7^{14}}$	6.3×10^{7e}		$1.51 \times 10^{3^{14}}$	
(+)-VX	$2.0 \times 10^{6*}$								
(-)-VX	4.0×10^6								
VR									
(±)-VR			4.60×10^{14}	1.95×10^{14}	1.88×10^{14}				
CVX									
(±)-CVX			3.06×10^{14}		1.46×10^{14}				

Обезвреживание ФОВ (зарина, зомана, вещества типа VX) начинается сразу при их поступлении через внешние барьеры и резорбции в кровь.

В крови ФОВ и их метаболиты связываются с белками, липопротеидами, из которых наибольшее значение имеет сывороточный альбумин, с которым образуются аддукты: зарина (О-изопропилметилфосфонат-серин), зомана (О-пинаколилметилфосфонат-серин), VX (О-этилметилфосфонат-серин). Альбумин способен связывать зоман, зарин и RVX, что влияет на его эстеразную активность вследствие образования аддуктов с данными ФОВ по Tyr-411 и Tyr-150. Полагают, что сайт альбумина Ser193 участвует в связывании или гидролизе зомана (Гончаров Н.В. и соавт, 2012 г.).

Путем биотрансформации ФОВ подвергаются гидролизу, окислению, конъюгации и т.д., с образованием в большинстве случаев менее токсичных и более гидрофильных соединений, которые выводятся почками.



Метаболизм 1 фазы биотрансформации осуществляется немикросомальными сериновыми гидроксилазами: бутирилхолинэстеразой и карбоксилэстеразами, а также параоксоназами.

БХЭ стехиометрически связывается с ФОВ, препятствуя их воздействию на АХЭ вследствие быстрого взаимодействия ФОВ с БХЭ с последующим «старением» фосфонилированного фермента.

Фосфорилированная КЭ плазмы подвергается быстрой спонтанной реактивации с образованием нетоксичных и неактивных метаболитов ФОВ. КЭ способна восстанавливать активность после ингибирования заринном и другими ФОВ, наибольшая активность КЭ наблюдается в печени, активность гидролиза ФОВ человеческой КЭ низка.

Параоксоназы, относящиеся к классу А-эстераз, являются субстратами ФОВ. Наибольшее значение имеет параоксоназа-1 (PON-1), которая инактивирует зарин, зоман, табун, и другие органофосфаты.

Кроме того, ферменты, гидролизующие ФОС, включая ФОВ (Walker, С. (1993), по современной классификации распределяются на основе типа химической связи расщепления вещества (табл. 1).

Таблица 1 – Классификация ферментов, гидролизующих ФОВ по типу химической связи

Класс	Название	Химическая связь	Ферменты	ФОВ
Е.С. 3.1.8.1	Арилдиалкил- фосфатазы	P–O P–S	Параоксоназа Органофосфатгидр о-лаза Фосфотриэстераза и др.	VX
Е.С. 3.1.8.2	Диизопропилфто рфосфатазы	P–F	Зоманаза Зариназа Кислая органофосфатан- гидролаза	Зоман Зарин



Усиление токсических эффектов при действии ФОВ на индивидуумов и популяции во многом связано с полиморфизмом генов, в том числе вызывающих дефекты эстераз, метаболизирующих ФОВ, таких как БХА и PON1.

Для гена БХЭ описано большое количество мутаций. К неблагоприятным относятся «медленные» аллели (A209G и др.), вызывающие ингибирование фермента.

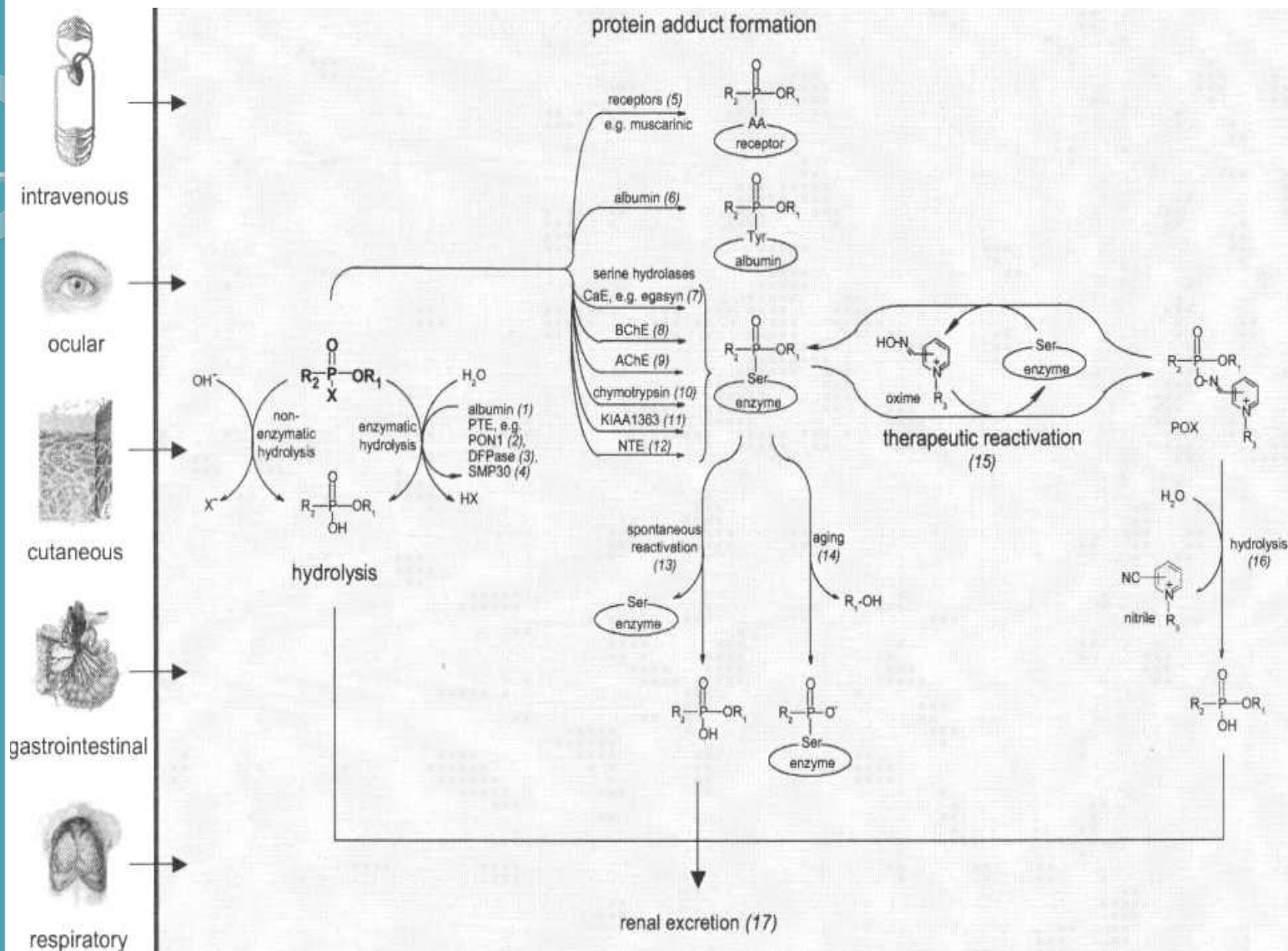
Из более 200 единичных нуклеотидных полиморфизмов гена PON-1 распространенными являются изоформы L55M и Q192R, значимо влияющие на каталитическую активность фермента.

Аллель M ассоциирован с ингибированием метаболизма ФОВ. ФОС (ФОВ)-индуцированная патология также характерна для лиц с генотипом 192R гена PON-1.

Аллели 192R полиморфизма Q192R и 55M гена PON1 достоверно чаще встречаются у лиц, имеющих сердечно-сосудистые заболевания.

Встречаемость лиц с перечисленными полиморфизмами должна настораживать в плане возможности повышения риска развития неблагоприятных эффектов при контакте с ФОВ.

Metabolism and elimination





Между процессами детоксикации и иммунным ответом на действие ФОВ существует тесное взаимодействие.

Выраженное влияние ФОВ на иммунную систему, взаимосвязанное с их биотрансформацией, выявлено как в условиях эксперимента, так и при клинко-эпидемиологических исследованиях лиц, подвергавшихся воздействию данных ОВ. Основные мембранные CD-маркеры лейкоцитов и других иммунокомпетентных клеток, участвующих в иммунном ответе на действие ФОВ представлены в таблице 2.

На рисунке 2 представлены основные звенья нарушения иммунной защиты при действии ФОВ.

Под влиянием ФОВ отмечено снижение концентрации в крови цитокинов (ИФН- γ , ИЛ-4 ИЛ-2, ИЛ-6 и др.), с которым связано угнетение функций Th1- и Th2-лимфоцитов.

Снижение специфического (адаптивного) клеточного ответа на ФОВ более выражено, чем врожденного иммунитета.

ФОВ действуют как гаптены, вызывая специфическую сенсибилизацию, повышенную чувствительность к собственным белковым структурам организма (аутоенсибилизация), развитие вторичного иммунодефицита и другой патологии.

Таблица 2 – Мембранные CD-маркеры иммунного ответа на действие ФОВ

CD-маркер	Тип клеток	Функция
CD1	Т-лимфоцит	молекула HLA класса. Участие в представлении антигена
CD2		адгезия Т-лимфоцитов к эндотелию цитотоксических Т-лимфоцитов, к клеткам мишеням, тимоцитов к тимическим эпителиальным клеткам
CD3		маркер большинства зрелых Т-лимфоцитов – молекулы TCR
CD4		маркер Т-хелперов. Ко-рецептор для Т-клеточного рецептора
CD5	Т- и В-лимфоцит	маркер В1-лимфоцитов
CD8	Т-лимфоцит	маркер цитотоксических Т-лимфоцитов
CD14	моноциты	рецептор для В-клеточного иммунорецептора
CD16	естественный киллер	Fc-рецептор. Участие в фагоцитозе, антителозависимой клеточной цитотоксичности
CD18	лейкоциты	интегрин β , вовлекаемый во взаимодействие между клетками и клеток с матрицей
CD19	В-лимфоциты	ко-рецептор для В-клеточного иммунорецептора
CD20		регуляция активации В-клеток, формируя кальциевые каналы
CD21	зрелые В-лимфоциты	ко-рецептор для В-клеточного рецептора. Рецептор для C3d-комплемента
CD22	В-лимфоциты	маркер зрелых В-лимфоцитов. Адгезия В-клеток к эритроцитам, Т-клеткам, моноцитам и макрофагам
CD25	Т-лимфоциты	рецептор для ИЛ2. Маркер активированного лимфоцита
CD28	Т-лимфоциты	рецептор Т-хелпера для взаимодействия с костимулирующим фактором (CD80/ CD86) антигенпрезентирующей клетки (АПК)
CD56	естественный киллер	активация цитотоксичности и синтеза цитокинов
CD64	моноциты, макрофаги	высокоаффинный рецептор для IgG ($IgG_3 > IgG_1 > IgG_4 \gg IgG_2$)
CD94	естественный киллер	Ингибция/активация цитотоксичности естественных киллеров
CD95	разные клетки	молекула Fas, маркер апоптоза клеток



Рис.2 Развитие патологии вследствие нарушения иммунной защиты под влиянием ФОВ

Патогенетически значимым токсическим свойством ФОВ является их прооксидантное действие.

Окислительный стресс играет важную роль в патогенезе старения, широкого спектра сердечно-сосудистых заболеваний (в том числе кардиомиопатии, атеросклероза, ИБС), канцерогенеза и т.д.

Из механизмов, снижающих окислительный стресс, большое значение имеет антиоксидантная система (АОС), осуществляющая нейтрализацию активных форм кислорода специальными молекулами-восстановителями и ферментами.

Полиморфные варианты генов АОС, обуславливая функциональную вариативность белковых продуктов, влияют на широкий спектр биохимических реакций, в том числе сопровождающихся активацией патологических процессов, детерминирующих риск развития различных заболеваний (табл. 3). Эти нарушения у носителей «неблагоприятных» аллелей генов могут усиливаться при контакте с ФОВ.

Таблица 3 – Некоторые аллельные варианты генов, кодирующих ферменты антиоксидантной системы

Ген	Аллель (генотип)	Предрасположенность (резистентность) к патологии
SOD2 (Супероксиддисмутаза)	С (Т/С и С/С)	Онкологические заболевания, гипертоническая болезнь, нейродегенеративное состояние, дилатационная кардиомиопатия
CAT (каталаза)	Т (Т/Т и С/Т); G (G/G)	Заболевания сердечно-сосудистой системы, бронхиальная астма, профессиональный бронхит, онкологические заболевания
	А (А/А)	Заболевания сердечно-сосудистой системы у курильщиков и злоупотребляющих алкоголем, детское ожирение
	Т (Т/А и Т/Т)	Отсутствие заболеваний сердечно-сосудистой системы у мужчин, ведущих здоровый образ жизни
GPX1 (глутатион-пероксидаза)	(Pro198Leu)	Заболевания сердечно-сосудистой системы, аллергическая и неаллергическая формы бронхиальной астмы у мужчин
GPX4	Т(С/Т и Т/Т) С (С/С)	Онкологические заболевания
CYBA (НАДФН-оксидаза)	Т(Т/Т) (640AA) (С242Т)	ИБС Язвенная болезнь Долгожительство (женщины)
NQO1 (NAD(P)H – хиноноксидоредуктаза)	С(С/Т)	Хроническая обструктивная болезнь легких
GCLC (глутаматцистеинлигаза)	Т (Т/Т)	Сахарный диабет 1 типа ИБС
NRF2 (транскрипционный фактор)	Т (Т/Т)	Рак легких у курильщиков, рак молочной железы, венозный тромбоз
	А (А/А)	Рак молочной железы

Важной проблемой в настоящее время является прогноз риска развития отдаленных эффектов у персонала объектов по ХУХО, хотя наличия ФОВ и продуктов их деструкции в производственной среде не обнаружено.

У персонала объектов по ХУХО ФОВ наряду с характерными для эффектов данных ОВ симптомами, отмечены изменения клеточного иммунитета в виде увеличения числа Т-хелперов (CD4⁺), цитотоксических лимфоцитов (CD8⁺), естественных киллеров (CD16⁺), снижения числа клеток, экспрессирующих маркеры CD25⁺ и CD95⁺, повышения клеток с γ -маркером HLA-DR⁺, онкомаркерами (Янно Л.В. и соавт., 2011). Наблюдалась тенденция к снижению содержания IgM и IgG в крови в сочетании с уменьшением количества В-лимфоцитов (CD20⁺). Изучение «цитокинового профиля» у работавших с ФОВ выявило тенденцию к снижению провосполительных (ИЛ2, ИЛ6, TNF α ; IFN γ и др.) и противовоспалительных (ИЛ4, ИЛ10, ИЛ13) цитокинов, а также ИЛ10; ИЛ 9; ИЛ17. Показано повышение уровня хемокина эотаксина (Гончаров Н.В. и соавт., 2012 г.), участвующего в активации эозинофилов, базофилов и других провоспалительных клеток при аллергических реакциях.



Таким образом, наряду со снижением активности БХЭ, изменением уровня PON1 выявленные иммунные, а также гематологические и другие сдвиги показателей состояния здоровья у работников могут быть связаны не только с высокой нейropsychической напряженностью и работой в изолирующих костюмах, но с возможностью воздействия ФОВ и продуктов их деструкции на организм в малых дозах. После длительного скрытого периода могут развиваться отдаленные эффекты данных ФОВ, что наблюдалось у персонала бывшего производства VX

Для своевременного выявления предрасположенности к развитию начальных и других отклонений здоровья, значимых для действия ФОВ, необходимо комплексное определение показателей активности ферментов биотрансформации и антиоксидантной (БХА, PON1, каталаза, супероксиддисмутаза и др.) защиты, иммунной системы. Необходимо продолжить выбор генетических маркеров, влияющих на ухудшение здоровья лиц, контактирующих с ФОВ, который осуществляется .



Для оценки нейро-, иммуно-, гепатотоксических эффектов ФОВ и антиоксидантной защиты организма проведен поиск новых потенциальных маркерных генов-мишеней их действия на культурах клеток нейробластомы SH-SY5Y (Радилов А.С., Бельтюков П.П. и соавт., 2014). В частности, из 84 проанализированных генов только для ARG1, NOSTRIN, PAPPA, PLP1, TACR1 отмечена взаимосвязь между снижением их экспрессии и изученными концентрациями зомана; выявлена повышенная экспрессия SEMA3B. Функционально ARG1 и NOSTRIN связаны с процессами метаболизма NO в нервной ткани, печени и др. Изменение экспрессии гена PLP1 является маркером острой интоксикации зомана на ранних сроках. К потенциальным мишеням ФОВ был отнесен ряд белков, не являющихся ферментами класса гидролаз (серин/треонин протеинкиназа, ЛДГ, синтетаза жирных кислот и др.), структурные белки (тубулин, рибосомальный белок, регулятор актина 2), регуляторные и ядерные белки (MAP киназа 6, ядерный рибонуклеопротеин K, белки семейства 14-3-3 и др.).

Выявление этих ранее неизвестных белков-мишеней ФОВ позволяет более обосновано предполагать молекулярные механизмы нехолинергического влияния ФОВ на организм.



При оценке степени реального риска здоровью до настоящего времени в качестве основного критерия используются медико-демографические показатели (в основном заболеваемости), которые широко применяются в эпидемиологических исследованиях влияния химического фактора на человека, а также при оценке распространенности сердечно-сосудистых, онкологических и других заболеваний. В этих ситуациях оценивается выраженная патология, когда профилактические мероприятия «запаздывают».

Для определения вероятности развития начальных отклонений гомеостаза, наследственной предрасположенности или, наоборот, резистентности к действию разнообразных факторов, включая ФОВ, необходимо в методологию оценки риска включать и молекулярно-биохимические критерии, используя современные технологии обработки данных, достаточно подробно изложенные в литературе.

Как видно из рисунка 3, генетико-биохимические показатели оценки защитных механизмов могут быть эффективными для выявления восприимчивости и резистентности организма к ФОВ, донозологических сдвигов и ранних проявлений неспецифических патологических изменений.

Гигиенические критерии:
Гигиенические нормативы
(ПДК, ПДУ, ОБУВ, ОДК,
ОДУ, МДК, АПВ)
Р е ф е р е н т н ы е
концентрации (дозы)
П а р а м е т р ы
токсикометрии

Состояние
производственной и
окружающей среды.
Потенциальный
риск

Состояние
здоровья.
Реальный
риск
Медико-социальный
ущерб

Критерии и показатели
(клинические, молекулярно-
генетические, биохимические,
иммунологические и др.)
оценки состояния здоровья:
•Показатели биомониторинга,
восприимчивости и
резистентности
•Критерии **донозологических**
двигов
•Критерии **неспецифических**
патологических изменений
•К р и т е р и и **р а з в и т и я**
профзаболевания
•Демографические и медико-
статистические показатели

Динамический санитарно -
эпидемиологический надзор

Динамические наблюдения за состоянием
здоровья людей

Мониторинг и оценка риска. Прогноз. Управление риском

Рис. 3 Система оценки риска здоровью персонала и населения



Для количественной оценки риска нарушения защитных механизмов при воздействии ФОВ на человека наряду с оценкой показателей заболеваемости рекомендуем рассчитывать реальный риск распространенности в обследуемых когортах лиц с полиморфизмом генов, а также изменениями показателей детоксикации, а именно риски:

- абсолютный,**
- относительный ,**
- атрибутивный,**
- атрибутивная фракция риска,**
- отношение шансов.**

Учитывая достаточно большую стабильность гомеостаза при низкоуровневом воздействии ФОВ и малую выборку контингента наблюдения для выявления скрытых закономерностей целесообразно использование методов многомерной статистики.



Заключение. Проведенные в ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России исследования свидетельствуют, что снижение активности ферментов биотрансформации, нарушение функций иммунной и других защитных систем может быть обусловлено низкоуровневым действием продуктов ФОВ на фоне генетической предрасположенности организма к развитию «неспецифической» патологии и дефектам обезвреживания ФОВ.

Для оценки риска влияния ФОВ на здоровье (включая отдаленные эффекты) человека необходимо продолжение поиска и апробации новых биомаркеров, в первую очередь патогенетически значимых полиморфизмов генов основных звеньев системы детоксикации, обуславливающих индивидуальный ответ организма на токсикант.

Динамические углубленные обследования лиц, имевших и имеющих контакт с ФОВ и продуктами их уничтожения, с использованием новых методов диагностики ранних и отдаленных эффектов ФОВ обеспечит выявление групп риска развития отдаленных эффектов, оценку эффективности разработанных лечебно-профилактических мероприятий и снижение риска здоровью персонала и граждан, подвергнувшимся воздействию данных особо опасных ОВ.

СПАСИБО
за
ВНИМАНИЕ!