

ВОПРОСЫ БИОМОНИТОРИНГА ТОКСИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ В БИОПРОМЫШЛЕННОСТИ

С. С. ОГАНЕСЯН, А. Г. АГАМАЛЯН, М. А. КЛИФАДЖЯН

Институт кардиологии МЗ Армении

С помощью автоматической записи кинетики разрушения мембран эритроцитов (гемолиз), используя 1—2 капли крови из пальца исследуемого определяли действие органических соединений, применяемых в производстве витаминов. Показано, что эти соединения раздельно и в смеси имеют различные воздействия. В количествах, применяемых из отдельных участков производства, эти соединения не обладают вредным действием кроме толуола, способного в малых концентрациях снижать устойчивость клеточной мембраны эритроцитов.

Էրիթրոցիտների քայքայման կինետիկան (հեմոլիզ) կենտրոնալ գրանցման եղանակով, մաքուր մասերի վրա 1—2 մեկ-եւեր կաթիլ արյունում, հետազոտվել է փրամախենների արտադրությանը ազդող որոշակի օրգանական միացությունների ազդեցությունը: Առանձին և միասին այդ օրգանական միացությունները չունեն զգալի վնասակար ազդեցություն, բացի տոլուոլից, որի ցածր քանակները փոփոխում են քայքայման կինետիկան:

The using of automatical registration was determined of kinetic parameters of the erythrocyte hemolysis in the probs of 1—2 drops of blood in worker at vitamin production. Among a many organic compounds only toluen has any significantly influence on the stability of cell membrane in not high concentration.

Гемолиз — мембраны эритроцитов-биомониторинг

Из существующих методов биомониторинга, как указывается в ряде исследований [1—3], необходимо выбрать те тесты, которые малоинвазивны, легко выполнимы при массовых исследованиях и в этическом отношении приемлемы. Среди подобных тестов, на наш взгляд, наиболее целесообразным является многократное исследование концентрации вредных веществ в слюне человека, что совпадает с такими же исследованиями в плазме крови. В литературе накоплено много сведений, полученных на основании анализов слюны, которые сейчас широко используются в клинических, а также в фармакокинетических исследованиях [4—6].

Нами использован также малоинвазивный способ биомониторинга действия токсических веществ на устойчивость структуры эритроцитов крови, полученной в виде 1—2 капель из пальца испытуемого. Разработанный метод автоматической записи кинетики и фазового анализа разрушения мембран эритроцитов (гемолиз) и их агрегации позволяет в течение нескольких минут получить достаточно четкую информацию о влиянии вредных факторов на мембраны красных кровяных клеток, участвующих в снабжении тканей кислородом [7—8]. Этот метод дает возможность сопоставить данные, полученные на эритроцитах работников разных участков производства, с результатами анализа совмести-

го или изолированного действия токсических веществ в зависимости от их концентрации в среде при работе с кровью здоровых доноров. Исследование проведено на Греванском витаминном заводе в течение 1989—1990 годов. За помощь и поддержку выражаем благодарность коллективу завода.

Материал и методика. Фазный анализ и параметры кинетики кислотного и осмотического гемолиза эритроцитов определяли с помощью модифицированной нами фотометрической записи скорости и спектрофотометрического определения выхода гемоглобина из клеток [9]. Методы получения крови из пальца испытуемого и приготовления пробы для гемолиза описаны [10]. Число испытуемых составляло 90 человек, из которых 60 мужчин и 30 женщины в возрасте от 25 до 60 лет. Донорскую кровь любезно предоставлял Институт гематологии МЗ Армении, частично—здоровые сотрудники лаборатории.

В условиях эксперимента на суспензии эритроцитов было испытано действие следующих соединений, которые используются на разных участках производства витамина С: ацетон, ксилол, этиловый спирт, хлороформ и четыреххлористый углерод. Оценивали влияние на гемолиз эритроцитов широкого ряда концентраций указанных соединений, от 10^{-6} до 10^{-1} М/л.

Первичный врачебный осмотр позволил исключить из рассмотренных групп нездоровых лиц. Результаты обрабатывались статистически по критерию Стьюдента.

Были исследованы следующие параметры процесса гемолиза эритроцитов: максимальная скорость гемолиза эритроцитов (V), общее время гемолиза в сек (I), длительность начальной, скрытой «лаг-фазы» (T), остаточное светопропускание после окончания гемолиза (b). Способы расчета указанных параметров приведены в работе [10].

Исследуемое соединение известной концентрации инкубировали с пробой крови при температуре 37°C в течение 90 минут. В суспензию крови на 180 мкл вносили 20 мкл испытуемого соединения или же смеси соединений, разбавленных в 15 мМ Трис-НСI буфере, (рН 7,4), содержащем 0,9% NaCl. В контрольных пробах инкубацию проводили с тем же буфером. В каждом случае повторяемость измерений—5-кратная.

Результаты и обсуждение. Как было показано [10], различные кинетические параметры гемолиза эритроцитов не изменяются однозначно. Достоверно повышена максимальная скорость кислотного гемолиза эритроцитов у работников, занятых на производстве витамина С, у них обнаруживается и некоторое повышение величины остаточного светопропускания и снижение общего времени гемолиза (I), что совпадает с укорочением начальной «лаг-фазы» (T). Существенных изменений в показателях кинетики процесса осмогомолиза не наблюдалось, что указывает на повышенную чувствительность к действию токсических веществ на процесс разрушения эритроцитов при кислотном гемолизе.

На участках производства витамина С (аскорбиновой кислоты) в воздухе встречаются ацетон, хлороформ, пыль витамина С, спирт, шелочи. Рабочие имеют дело и с другими веществами, такими как соляная кислота, серная и азотная кислоты. В цехе производства витамина Е обнаруживаются также толуол, уксусный ангидрид, метанол, ксилол, бензол. Однако все эти соединения встречаются в концентрациях ниже предельно допустимых.

Сравнение действия отдельных соединений в эксперименте на донорской крови показало, что в концентрациях ниже ПДК многие из них не оказывают какого-либо влияния на кислотный и осмотический гемолиз. Хлороформ в концентрациях 10^{-5} — 10^{-1} М/л вызывает небольшое снижение общей длительности гемолиза и «лаг-фазы», более или менее четко снижается остаточное светопропускание (b), до $20 \pm 0,25\%$. Установлено, что в данном случае снижение последнего показателя связано с тем, что высокие концентрации хлороформа способны вызвать предгемолиз определенной части эритроцитов. Возрастание величины b при очень низких концентрациях (10^{-4} М/л), вероятно, указывает на способность этой концентрации стабилизировать мембрану эритроцитов. При осмотическом гемолизе обнаруживается гораздо более сильное влияние—стабилизация мембран эритроцитов наблюдается уже при концентрации хлороформа 10^{-4} М/л. При 10^{-2} — 10^{-1} М/л наблюдается резкое увеличение максимальной скорости гемолиза — на 80—65% и снижение общей длительности гемолиза, а также величины остаточного светопропускания. Таким образом, учитывая различные механизмы гемолиза эритроцитов под влиянием кислоты и гипотонического раствора, можно заключить, что влияние хлороформа скорее отражается на взаимодействии белков и липидов мембран, что выражается в значительном повышении максимальной скорости на кооперативной фазе разрушения мембраны эритроцитов.

В отличие от хлороформа толуол в более низких концентрациях (10^{-4} — 10^{-2} М/л) вызывает значительные изменения всех параметров кроме общей длительности кислотного и осмотического гемолиза.

Причем, в отличие от хлороформа он вызывает ускорение осмотического гемолиза в меньшей степени.

Поскольку ПДК толуола составляет $2 \cdot 10^{-6}$ М/л, надо полагать, что он, благодаря своей липофильности, вызывает нарушения структурного состояния липидов и их взаимодействия с цитоскелетными белками эритроцитов уже в малых концентрациях. Причем в концентрациях 10^{-1} М/л толуол проявляет соответствующий гемолитический эффект. Что касается уменьшения максимальной скорости гемолиза — то можно предположить, что это связано с предгемолизом. Отметим, что в литературе имеются сведения о снижении количества эритроцитов у рабочих, длительно контактирующих с толуолом на производстве [11]. Следовательно, представляется целесообразным особое внимание обратить на уменьшение концентрации толуола на производстве.

Этиловый спирт оказывает незначительное влияние на кинетические параметры кислотного и осмотического гемолиза даже в достаточно больших концентрациях—(10^{-1} М/л). Укажем, что его ПДК составляет $2 \cdot 10^{-4}$ М/л.

Ацетон в концентрациях 10^{-2} М/л— 10^{-1} М/л (ПДК— $4 \cdot 10^{-4}$ М/л) не оказывает значительного влияния на кислотный гемолиз. Только в концентрациях выше 10^{-1} М/л ацетон замедляет скорость кислотного и ускоряет скорость осмотического гемолиза, отражаясь на общей длительности самого процесса.

Ксилол—наиболее сильное гемолитическое средство. Он сам вызывает гемолиз уже при концентрации 10^{-2} М/л (ПДК— $5 \cdot 10^{-4}$ М/л). В концентрациях 10^{-4} — 10^{-3} М/л ускоряет осмотический и незначительный кислотный гемолиз. Известна его токсичность при длительном воздействии на кроветворные органы [12—13]. Возможно, это связано с тем, что ксилол имеет мембраномодифицирующий эффект. Полученные результаты требуют дальнейшего изучения его действия в зависимости от длительности пребывания рабочего в среде, содержащей ксилол.

При определении действия смеси указанных соединений на суспензию эритроцитов были испытаны те количества, которые соответствуют уровню ПДК. В смеси эти соединения приводят к незначительным изменениям скорости и длительности гемолиза, в большей степени отражаясь на величине остаточного светопропускания, т.е. способны вызывать небольшой предгемолиз. Так как в условиях производства некоторые из этих соединений даже не достигают уровня ПДК, то их эффект не может быть значительным, как мы отметили, кроме эффекта толуола и ксилола. Из сравнительного анализа видно, что при комплексном воздействии этих соединений их эффект выражен больше, чем при их действии в отдельности. Кроме того, появляются разнонаправленные изменения отдельных кинетических параметров гемолиза, что указывает на различия их «мишеней» в клетке. В случае длительного воздействия смесей непосредственно на производственных участках, при превышении указанных в настоящей работе концентраций, сдвиги в устойчивости структуры мембран эритроцитов могут дать дополнительную информацию о влиянии вредных веществ на кроветворные органы. Изучение действия этих веществ на эритроциты позволяет выявить их влияние на отдельные компоненты мембран клеток, что в конечном итоге может быть использовано для разработки профилактических и терапевтических мер. Реакция эритроцитов является высокочувствительным тестом и может быть использована для биомониторинга небольших изменений концентраций токсических веществ в среде. Это обусловлено способностью эритроцитарных мембран реагировать на указанные соединения в значительно меньших, чем предельно допустимые дозы, концентрациях.

Использование данных о кинетике гемолиза эритроцитов при исследовании действия экологических факторов не ограничивается оценкой степени вредности промышленных отходов. Легкость получения проб крови из пальца в малых количествах, возможность их хранения до 4—6 часов, повторные анализы через определенные промежутки времени, позволяют применять этот метод в качестве биомониторинга среди больших групп населения. Детальное изучение устойчивости мембран эритроцитов важно также для оценки изменений их метаболизма, в частности, при появлении мутаций на уровне синтеза фермента глюкозо-6-фосфогидрогеназы, приводящей к гемолитической неустойчивости эритроцитов. Не исключено использование эритроцитов и для би-

омониторинга аллергических реакций в организме в связи с данными, указывающими на гемолитическое действие многих лекарств, к которым обнаруживается аллергическая реакция [14]. В отличие от методов биохимического анализа, оценка кинетических показателей гемолита эритроцитов при более детальном развитии, на наш взгляд, может служить несложным и достаточно информативным способом биомониторинга экологической ситуации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баевский Р. М. Прогнозирование состояний на грани нормы и патологии, М., 1979.
2. Давыденко Н. В., Колчинский В. И. Вопросы питания, 6, 17—19, 1983.
3. Бердышев В. В. Воен. мед. журнал, 6, 47—48, 1986.
4. Барабаш Р. Д., Гекелюк Е. К., Вакуленко Л. В., Бандаренко В. С. Вопросы мед. химии, 27, 1, 22—27, 1981.
5. Пожарицкая М. М., Старосельцева Л. К., Князева А. П. Стоматология, 64, 4, 13—14, 1985.
6. Дударь Л. В., Гусак М. И. Врачебное дело, 12, 32—34, 1981.
7. Агамалян А. Г., Оганесян С. С., Космич, биол. 6, 60—62, 1983.
8. Агамалян А. Г. Автореф. канд. дисс., Ереван, 1988.
9. Агамалян А. Г., Карпенко В. И., Мкртчян О. А. Биолог. журнал Армении, 41, 1, 46—50, 1988.
10. Оганесян С. С., Агамалян А. Г., Газарян Н. Л., Мартиросян П. М., Аракелян А. С. Биолог. журнал, Армения, 12, 977—984, 1990.
M M hacl A. I. Environ. Carcinog. Methods Anal. and Exposure Meas. Lyon, 10, 3—8, 1988.
12. Sato A. Environ. Carcinog. Methods Anal. and Exposure Meas., 10, 47—64, 1988.
13. Larwerys R., Bichet J. P. Environ. Carcinog. Methods Anal. and Exposure Meas., 10, 205—222, 1984.
14. Муравьев И. А., Кузьмин В. Э., Кудрин А. Н. Несовместимость лекарственных веществ, М., 1978.

Поступило 10. V. 1990.

Биолог. журн. Армении, № 1 (47) 1994

УДК 577.152.273:577.151.64:577:15:04

ВЛИЯНИЕ ХРОНИЧЕСКОЙ ИНТОКСИКАЦИИ УКРИНОЛОМ НА АКТИВНОСТЬ КРЕАТИНКИНАЗЫ, ПУРИННУКЛЕОЗИДФОСФОРИЛАЗЫ, АЛАНИНАМИНОТРАНСФЕРАЗЫ И АСПАРТАТАМИНОТРАНСФЕРАЗЫ КРЫС И ЧЕЛОВЕКА

Л. С. НЕРСЕОВА, М. Г. ГАЗАРЯНЦ, Г. О. МЕЛИКСЕТАН, Э. С. МКРТЧЯН,
И. М. ЗАРАФЯН, Л. Г. ЛОГОСЯН, С. А. КОСЯН, Ж. И. АКОПЯН

Институт молекулярной биологии НАН Армении, Ереван

Под воздействием укринила у рабочих наблюдается повышение активности креатинкиназы в сыворотке крови на 50%, что может служить тестом для определения степени интоксикации организма этим токсином.

Հետազոտված է ուկրինոլի քրոնիկ թունավորման ազդեցութեան ամենտեղի մի քանք արգանները և մարդու առյան շրճուկի կրեատինէկինազի, սպարտէտէկէտո-