

Ю.И. Черняк, А.А. Шелепчиков, Д.А. Грассман

## МОДИФИКАЦИЯ ДИОКСИН-СИГНАЛЬНОГО ПУТИ У ВЫСОКОЭКСПОНИРОВАННЫХ ПОЖАРНЫХ

АФ – НИИ медицины труда и экологии человека ГУ НЦ МЭ ВСНЦ СО РАМН (Ангарск)  
Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН (Москва)  
Бруклинский колледж Городского Университета Нью-Йорка (Нью-Йорк)

В 1992 году более 500 пожарных были вовлечены в ликвидацию крупного промышленного пожара около г. Шелехов. Часть этих пожарных, а также пожарные из контрольной группы были привлечены к настоящему обследованию. Анализ содержания диоксинов в липидах сыворотки крови 20 пожарных позволил заключить, что мы имеем дело с уникальной когортой, имеющей высокую степень воздействия диоксидами, вероятно, связанную с их профессиональной деятельностью в качестве пожарных. Установлена высокая степень корреляции между компонентами диоксин-сигнального пути: как между показателями экспрессии диоксинчувствительных генов AhR, CYP1A1 и CYP1B1, а также последних с CYP1A2-активностью, оцененной антипириновым метаболическим тестом. Очевидно, что воздействие диоксинов изменяло сигнальный путь, что выражалось в корреляции между суммарным токсическим эквивалентом диоксинов ( $TEQ_{\text{ПХДД}+\text{ПХДФ}+\text{ПХБ}}$ ) и активностью цитохрома P4501A2. Выявлено также, что содержание 1,2,3,7,8-пентахлордибензо-р-диоксида (1,2,3,7,8-ПeХДД) в липидах сыворотки крови было связано с экспрессией CYP1B1.

**Ключевые слова:** диоксины, экспрессия генов, Ah-рецептор, CYP1A и CYP1B1

## MODIFICATION OF THE DIOXIN SIGNALING PATHWAY IN HIGHLY EXPOSED FIREFIGHTERS

Y.I. Chernyak, A.A. Shelepchikov, J.A. Grassman

Research Institute of Industrial Medicine and Human Ecology SC ME ESSC SB RAMS, Angarsk  
Severtsov's Institute of Ecology and Evolution of RAS, Moscow  
Brooklyn College-City University of New York, New York

In 1992, more than 500 firefighters were involved in the suppression of a catastrophic industrial fire outside Shelekhov city. Those participating in the 1992 fire and matched firefighter controls have been the subject of ongoing study. Analysis of serum lipid-adjusted dioxin levels in 20 of the men led us to conclude that we were dealing with a unique cohort having a high degree of exposure to dioxins most likely due to their occupation as firefighters. There was a high degree of correlation between the components of the dioxin signaling pathway which encompassed both the expression of dioxin sensitive genes – AhR, CYP1A1 and CYP1B1 as well as CYP1A2 activity assessed by the antipyrine metabolite test. Evidence that dioxin exposure had altered the signaling pathway comes from the observation that the total toxic equivalent of dioxins ( $TEQ_{\text{PCDD}+\text{PCDF}+\text{PCB}}$ ) was correlated with cytochrome P4501A2 activity. We also found that the content of pentachlorodibenzo-p-dioxin (1,2,3,7,8-PeCDD) in blood serum lipids was related to the expression of CYP1B1.

**Key words:** dioxins, gene expression, firefighters, Ah-receptor, CYP1A and CYP1B1

Диоксины рассматриваются как один из наиболее токсичных классов антропогенных соединений, способных вызывать у человека разнообразные нарушения гомеостаза и здоровья [1, 10]. Реализация значительной части эффектов осуществляется при участии Ah-рецептора (AhR), который играет центральную роль в индукции ферментов 1-й фазы биотрансформации ксенобиотиков, а также выступает в качестве модулятора клеточных сигнальных путей [12, 17]. Предварительная оценка состояния систем биотрансформации ксенобиотиков у пожарных, участвовавших в ликвидации пожара на кабельном заводе в г. Шелехов, позволила выявить изменения, указывающие на их связь с воздействием диоксинов [3, 4]. Это означает, что диоксины могли внести вклад в формирование отдаленных эффектов, наблюдаемых у пожарных. У значительной части обследованных к настоящему времени пожарных сформировал-

ся синдромокомплекс в виде токсической энцефалопатии с органическими расстройствами психики и сенсорной полиневропатией с вегетативными нарушениями конечностей [2, 5, 6]. Хотя уже прошло около 15 лет после пожара, определение воздействия диоксинов возможно в силу длительного периода полувыведения большинства конгенов. Например, для 2,3,7,8-тетрахлордибензо-р-диоксида (ТХДД) и ПeХДД  $T_{1/2}$  составляет 7 – 10 и 15,7 лет, соответственно [15, 18].

В рамках российско-американского проекта «Эпидемиологическое исследование влияния воздействия продуктов горения, образовавшихся при пожаре в 1992 году на заводе «Иркутсккабель», на здоровье «шелеховских» пожарных» проведено углубленное исследование уровней диоксинов и некоторых AhR-зависимых элементов, определяющих экспрессию и активность диоксинчувствительных изоформ цитохрома P450 у пожарных. В

настоящей работе содержатся основные итоги названного проекта.

### МЕТОДИКА

В рамках проекта проведено обследование 165 пожарных, которые были разделены на четыре группы, сформированные на основании проявления синдрома комплекса. Первую группу составили пожарные, госпитализированные вскоре после пожара с симптомами острого отравления и последующим быстрым развитием синдрома комплекса. Вторую группу составили пожарные с симптомами острого отравления или без них, у которых синдромом комплекс проявился позднее; третью — пожарные с симптомами острого отравления или без них, у которых синдромом комплекс вообще не был выявлен. Четвертую группу составили пожарные, которые не принимали участия в ликвидации «шелеховского» пожара. От каждого пожарного было получено информированное согласие на участие в обследовании.

**Антипириновый тест.** В качестве субстрата энзиматической активности цитохрома P4501A2 использовали антипирин [7, 16, 20]. Антипирин фармакопейной чистоты (Fluka) в дозе 18 мг/кг веса тела принимался натощак, пробы мочи собирали в течение суток в емкость, содержащую 200 мг  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  для стабилизации метаболитов. Собранный моча тщательно перемешивалась, и из нее отбирался образец объемом 1 мл, который хранился при  $-20^\circ\text{C}$  до проведения анализа. Подготовку проб для жидкостной хроматографии проводили с использованием  $\beta$ -глюкуронидазы Туре Н-3 из *Helix pomatia* (Sigma) для проведения ферментного гидролиза конъюгированных метаболитов. Процедуру экстракции метаболитов выполняли в два этапа. Одну часть образца использовали для экстракции 4-гидроксиантипирина (4НАР) и норантипирина (НАР). Вторую часть образца использовали для оптимальной экстракции 3-гидроксиметилантипирина (3НМАР) и антипирина (АР). Пробы мочи анализировали на антипирин и его метаболиты методом ВЭЖХ на жидкостном хроматографе «Милихром-А02» (ЭкоНова, Россия)<sup>1</sup>. Колонка  $2 \times 75$  мм, Silasorb SPH C18, 5 мкм. Детектирование проводили при длине волны 244 нм. Для получения градиента смешивались два раствора: элюент А — смесь метанола и 0,05 М фосфатного буфера, рН 6,7 (10 : 90) и элюент В — 90 % метанол; скорость потока 200 мкл/мин; температура колонки  $45^\circ\text{C}$  [8]. Для достижения полного разделения анализируемых компонентов за минимальное время использовали сначала изократическое (7 % В, 10 мин), а затем градиентное элюирование от 7 до 100 % В за 4,5 мин. Калибровочные графики для АР и его метаболитов, построенные в координатах «площадь пика / площадь пика фенацетина (использованного в качестве внутреннего стандарта) — концентрация», представляли собой

прямые линии с коэффициентами корреляции  $R^2 > 0,98$ .

**Анализ экспрессии генов.** Для измерения экспрессии диоксин чувствительных генов от каждого обследуемого было получено по 30 — 35 мл цельной крови в шприцы с гепарином натрия в качестве антикоагулянта. Процедуру выделения лимфоцитов осуществляли методом градиентного центрифугирования с Histopaque 1077 (Sigma) в 50 мл стерильных полипропиленовых пробирках (Falcon или Elkay) с использованием РК4x780-ротора центрифуги ОС-6М в течение 20 мин при 700 g. Фракцию лимфоцитов дважды отмывали центрифугированием по 10 мин при 250 g в растворе Хенкса (HBSS, Sigma), после чего по 300 мкл лимфоцитов помещали в стерильные пробирки объемом 2 мл с закручивающимися крышками (Fisher Scientific) и добавляли 5-кратный объем РНК стабилизирующего реагента RNeasy Lysis Buffer (Qiagen). В таком виде образцы хранили при  $4^\circ\text{C}$  до и во время транспортировки в лабораторию биологического мониторинга Бруклинского колледжа Городского университета Нью-Йорка, где они отмывались центрифугированием от RNeasy Lysis Buffer, после чего хранились при  $-70^\circ\text{C}$ . РНК изолировали из лимфоцитов, используя набор RNeasy miniprep (Qiagen). Для количественного определения РНК осуществляли обратную транскрипцию (cDNA Archive), которую выполняли в 96-тилуночной планшете в Perkin Elmer 9700 термоджеле. При проведении количественного ПЦР использовали  $\beta$ -актин в качестве гена эндогенного контроля. В качестве контрольных образцов (калибратора кДНК) в каждой планшете использовали комбинацию РНК из крови человека и HEPG2 (ATCC). Результаты ПЦР-анализа образцов выражали в относительных единицах, где значение экспрессии нормализуется с эндогенным контролем, а затем сравнивается с нормализованной экспрессией калибратора. Например, для CYP1A1 это выражение имело вид: (количество мРНК CYP1A1 в образце РНК / количество мРНК  $\beta$ -актина в образце РНК) / (количество мРНК CYP1A1 в контрольном образце РНК / количество мРНК  $\beta$ -актина в контрольном образце РНК). ПЦР в реальном режиме времени выполнялась на приборе ABI 7500 с использованием праймеров от ABI [13].

**Количество диоксинов в сыворотке.** При выборе кандидатов для анализа на диоксины из числа обследуемых руководствовались требованиями, подробно изложенными в ранее опубликованной работе [9]. Примерно 60 мл крови из вены было получено от каждого участника и обработано в соответствии с протоколом CDC [11]. Забор крови осуществлялся у пожарных после 10 — 12-часового голодания в стеклянные вакутейнеры объемом 15 мл (Becton Dickinson) с красной пробкой. Для каждого человека использовалось 5 — 6 пробирок, которые заполнялись на 3/4, чтобы избежать контакта крови с резиновой пробкой. Далее в этих же

<sup>1</sup> Финансовая поддержка Минпромнауки РФ — «Развитие приборной базы научных организаций, 2002 г.».

пробирках по стандартной процедуре выделялась сыворотка. Сыворотка от одного человека переносилась специально обработанной стеклянной пипеткой в 40 мл сертифицированный на примеси боросиликатный флакон (I-СНЕМ) с закручивающейся крышкой и замораживалась при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Дистиллированная вода, набранная в вакутейнер и прошедшая обработку, аналогичную образцам крови, использовалась как холостая проба. 7 полихлорированных дибензодиоксинов (ПХДД), 10 полихлорированных дибензофуранов (ПХДФ) и 12 полихлорированных бифенилов (ПХБ) были проанализированы в каждом образце. Перед экстракцией в пробу вносили смесь изотопномеченных внутренних стандартов ПХДД/ПХДФ/ПХБ (Wellington Laboratories Inc.). Сывороточный экстракт очищался через многослойную колонку, содержащую слой импрегнированного серной кислотой силикагеля и силиката калия, разделенных осушителем, и кислотнo-основную колонку с силикагелем с последующим фракционированием на колонках с оксидом алюминия и углем. Целевые фракции анализировались на хромато-масс-спектрометре высокого разрешения (GC-HRMS Hewlett Packard HP 6890 Plus, Finnigan MAT 95XL) при разрешении около 10000, оснащенный DB-5ms колонкой (длина 20 м, внутренний диаметр 0,18 мм, толщина фазы 0,18 мкм, J&W Scientific). Каждая анализируемая серия включала холостой образец и четыре неизвестных образца. Перед вводом пробы в прибор, в экстракт вносили дополнительные изотопномеченные стандарты (recovery standards) для контроля степеней извлечения. Результаты анализа представлены в виде концентрации определяемых веществ в сыворотке, в пересчете на содержание липидов в единицах WHO-TEQ.

*Статистическая обработка результатов.* Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием пакета прикладных программ STATISTICA 5.0. При сравнении трех и

более групп использовали однофакторный дисперсионный анализ — метод ANOVA Краскела-Уоллиса, при попарном сравнении групп — U критерий Манна-Уитни с учетом поправки Бонферрони для коррекции уровня значимости  $p$ , а также коэффициенты корреляции Спирмена. Многофакторный регрессионный анализ проводился с использованием пакета прикладных программ SPSS 11.5.0.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализы на диоксины в образцах сыворотки крови пожарных (по 5 человек из каждой группы) позволили выявить высоко экспонированных диоксинами пожарных. У 11-ти из 20-ти пожарных суммарные токсические эквиваленты (TEQ) на момент обследования превышали 100 пг/г липидов. Из них у пяти пожарных TEQ были выше 200 пг/г липидов, а у 2-х — 400 пг/г липидов.

В таблице 1 представлены данные о содержании основных конгенов в сыворотке обследованных пожарных в зависимости от их принадлежности к группе. Принципиально, что все четыре группы не различались по возрасту, индексу массы тела или стажу. Не было выявлено значимых различий между группами по показателям, характеризующим уровни воздействия диоксинов (ТХДД, ПХДД, ПХДФ, ПХБ, или суммарный TEQ). При этом уровень диоксинов у пожарных 1-й группы был незначительно выше, чем в других группах. Необходимо отметить, что пожарные этой группы с 1993 — 1995 гг., примерно, уже 10 лет на момент обследования не работали в качестве пожарных. Сравнение «шелеховских» пожарных (группы 1 — 3) с контрольной группой выявило у первых более высокое содержание в организме ПХДД ( $p = 0,03$ ).

Групповой анализ на основании «шелеховского» синдрома комплекса (группы 1 и 2), «шелеховских» пожарных без такового (группа 3) и конт-

Таблица 1  
Содержание ТХДД, ПХДД, ПХДФ, ПХБ и ТЕQ в липидах сыворотки обследованных пожарных

Группы пожарных	n	Возраст, лет <sup>1</sup>	Индекс массы тела <sup>1</sup>	Стаж, лет <sup>1,4</sup>	ТХДД <sup>1,2</sup>	ПХДД <sup>1,2</sup>	ПХДФ <sup>1,2</sup>	ПХБ <sup>1,2</sup>	ТЕQ <sup>2,3</sup>
Группа 1	5	48,0 (6,1)	26,5 (2,7)	15 (4)	62 (62)	95 (88)	26 (12)	74 (60)	195 (79, 449)
Группа 2	5	42,3 (2,8)	29,0 (3,5)	16 (4)	40 (17)	94 (40)	18 (11)	39 (26)	151 (93, 257)
Группа 3	5	43,3 (4,5)	25,4 (3,1)	14 (5)	52 (80)	109 (179)	18 (9)	33 (19)	160 (50, 477)
Группа 4	5	42,2 (5,8)	25,6 (2,6)	14 (9)	13 (15)	27 (41)	17 (11)	61 (59)	105 (27, 205)
Группы 1–3	15	44,5 (5,0)	27,0 (3,3)	15 (4)	51 (56)	<b>100<sup>6</sup> (109)</b>	20 (11)	49 (41)	169 (50, 477)
Группа 4	5	42,2 (5,8)	25,6 (2,6)	14 (9)	13 (15)	<b>27 (41)</b>	17 (11)	61 (59)	105 (27, 205)
Группы 1–2	10	45,1 (5,4)	27,7 (3,2)	16 (4)	51 (44)	<b>95<sup>5</sup> (64)</b>	22 (12)	57 (47)	173 (79, 449)
Группа 3	5	43,3 (4,5)	25,4 (3,1)	14 (5)	52 (80)	<b>109 (179)</b>	18 (9)	33 (19)	160 (50, 477)
Группа 4	5	42,2 (5,8)	25,6 (2,6)	14 (9)	13 (15)	<b>27 (41)</b>	17 (11)	61 (59)	105 (27, 205)

Примечание: <sup>1</sup>M (SD), <sup>2</sup>WHO-TEQ, пг/г липидов, <sup>3</sup>(min, max), <sup>4</sup>стаж работы пожарным, <sup>5</sup> $p = 0,070$  ANOVA, <sup>6</sup> $p < 0,05$ , t-тест.

роля (группа 4) позволил выявить только тенденцию к различию названных групп по ПХДД ( $p = 0,07$ , ANOVA). Дальнейший межгрупповой анализ не показал значимых различий.

В целом полученные результаты свидетельствуют о том, что обследованная субкогорта пожарных имеет высокие уровни диоксинов в организме, в среднем для TEQ – 153 пг/г липидов. Выявленные уровни могли быть следствием воздействий диоксинов в процессе пожаротушения или источников окружающей среды. Однако пожаротушение в данном случае вносит основной вклад, что доказывается тенденцией к повышению уровней ПХДФ и ПХБ, наблюдаемых среди пожарных рядового состава. Участие в «шелеховском» пожаре привело к более высокому воздействию ПХДД. Прошло более 11 лет и вклад этого пожара уже не может быть точно определен из-за снижения уровней диоксинов в сыворотке. Принимая во внимание ограничения, связанные с малым числом участников обследования, можно сделать вывод о том, что «шелеховские» пожарные – это экспонированная диоксинами когорта.

Выявленные уровни превышают те, что наблюдаются при типичном воздействии окружающей среды в случаях ее загрязнения [14], но известны для профессионально экспонированных популяций [19].

В следующем разделе работы представлены результаты обследования антипириновым тестом 158 пожарных и доказательство диоксинзависимой индукции CYP1A2 у «шелеховских» пожарных, основываясь на измерении метаболитов антипирина.

В таблице 2 представлены результаты анализа для показателей, характеризующих метаболизм антипирина.

Результаты, полученные для полной когорты, указывают на то, что курение существенно влияет на образование метаболитов антипирина, и это согласуется с его способностью индуцировать CYP1A2.

Как следует из таблицы, обнаружены различия в метаболизме антипирина в сравниваемых группах. Проведенный однофакторный дисперсионный анализ выявил групповые различия для некурящих по трем показателям – ЗНМАР и сумме метаболитов (в % к принятой дозе АР), а также ЗНМАР (в % к сумме метаболитов АР). Следует отметить, что выявленные отличия у некурящих обусловила разница между группами 1 и 2, а также между группами 2 и 3. Принципиально, что отличия между группами курящих и некурящих пожарных (сравнение 4-х групп) имели похожий вид. Это может свидетельствовать о том, что использованный метод позволяет регистрировать эффект воздействия, несмотря на модификацию со стороны курения.

Сравнение метаболизма антипирина между группами некурящих показывает, что у пожарных из группы 2 образуется значительно меньше ЗНМАР, CYP1A2-связанного метаболита (выраженного либо как % от полной принятой дозы АР или % к сумме его метаболитов), чем в группах 1, 3 и 4. К тому же степень биотрансформации полученной дозы антипирина (сумма метаболитов АР) у этой группы пожарных оказалась ниже, в особенности в сравнении с группой 3, члены которой также подверглись воздействию на «шелеховском» пожаре, но до сих пор продолжают работать пожарными. Исходя из небольшого числа пожарных в группе 1, сравнение между группами 2 и 3 представляется более обоснованным. Снижение содержания ЗНМАР в группе 2 может быть связано как с прекращением воздействия продуктов

Таблица 2

Метаболизм антипирина у обследованных пожарных

	Курение <sup>1</sup> , (n = нет/да)	Когорта (n = 75/83)	Группа 1 (n = 6/9)	Группа 2 (n = 26/19)	Группа 3 (n = 25/28)	Группа 4 (n = 18/27)	P
Как процент от общей дозы АР							
NAP	Нет	16,2 ± 4,8	17,3 ± 2,4	15,3 ± 4,7	17,3 ± 4,8	15,7 ± 5,3	> 0,05
	Да	17,8 ± 5,9	16,1 ± 4,8	15,5 ± 4,6 <sup>4*</sup>	18,1 ± 6,4	19,8 ± 6,0	> 0,05
4НАР	Нет	<b>23,5 ± 8,2</b>	20,5 ± 9,1	21,9 ± 8,2	26,2 ± 6,6	23,0 ± 9,5	> 0,05
	Да	<b>29,2 ± 9,4<sup>5</sup></b>	24,2 ± 8,0	30,0 ± 10,4	30,7 ± 10,7	28,6 ± 7,5	> 0,05
ЗНМАР	Нет	<b>9,8 ± 5,9</b>	<b>11,4 ± 2,5<sup>2</sup></b>	<b>6,8 ± 4,4<sup>3</sup></b>	<b>12,6 ± 5,6</b>	<b>9,8 ± 7,4</b>	0,001*
	Да	<b>13,7 ± 6,7<sup>5</sup></b>	17,5 ± 7,7	12,4 ± 6,6	13,6 ± 7,8	13,5 ± 4,9	> 0,05
АР	Нет	3,1 ± 1,5	2,8 ± 1,7	2,8 ± 1,0	3,2 ± 1,2	3,4 ± 1,1	> 0,05
	Да	2,8 ± 1,2	2,3 ± 1,0	3,0 ± 1,3 <sup>4*</sup>	3,0 ± 1,4	2,7 ± 0,9	> 0,05
Сумма метаболитов	Нет	<b>49,5 ± 16,0</b>	<b>49,2 ± 8,4</b>	<b>44,0 ± 14,9<sup>3</sup></b>	<b>56,1 ± 13,2</b>	<b>48,5 ± 20,1</b>	0,030*
	Да	<b>60,7 ± 18,1<sup>5</sup></b>	57,8 ± 14,4	57,9 ± 18,5	62,4 ± 21,9	61,9 ± 14,9	> 0,05
Как процент от суммы метаболитов АР							
NAP	Нет	<b>33,7 ± 6,8</b>	36,2 ± 8,3	35,8 ± 7,2 <sup>3*</sup>	31,1 ± 6,2	33,4 ± 5,7	> 0,05
	Да	<b>29,7 ± 6,4<sup>5</sup></b>	<b>28,4 ± 7,5</b>	<b>27,9 ± 7,0<sup>4*</sup></b>	<b>29,3 ± 6,3<sup>4*</sup></b>	<b>32,0 ± 5,2</b>	0,028*
4НАР	Нет	47,5 ± 7,0	40,4 ± 11,8	49,2 ± 5,6	47,0 ± 6,4	47,9 ± 7,0	> 0,05
	Да	48,2 ± 6,4	<b>42,3 ± 8,4<sup>2*, 3*</sup></b>	<b>51,8 ± 5,7<sup>4</sup></b>	<b>49,4 ± 5,0<sup>4*</sup></b>	<b>46,4 ± 5,7</b>	0,002*
ЗНМАР	Нет	<b>18,8 ± 7,6</b>	<b>23,4 ± 5,5<sup>2</sup></b>	<b>14,9 ± 6,4<sup>3</sup></b>	<b>21,9 ± 7,7</b>	<b>18,7 ± 7,6</b>	0,003*
	Да	<b>22,1 ± 7,5<sup>5</sup></b>	29,4 ± 10,9 <sup>2*, 3*, 4*</sup>	20,3 ± 7,4	21,3 ± 6,9	21,7 ± 5,8	> 0,05

Примечание: M ± SD, \* ANOVA Краскела-Уоллиса,  $p < 0,05$ , <sup>1</sup> Статус курения: Нет = некурящие, Да = курящие, <sup>2, 3, 4</sup> относительно группы 2, группы 3 или группы 4, соответственно:  $p < 0,0083$ , U-критерий Манна-Уитни с учетом поправки Бонферрони, <sup>2\*, 3\*, 4\*</sup> относительно группы 2, группы 3 или группы 4, соответственно:  $0,008 < p < 0,05$ , U-критерий Манна-Уитни. <sup>5</sup> относительно подгруппы некурящих, t-тест Стьюдента,  $t < 0,05$ .



горения, способных индуцировать CYP1A2, так и большим возрастом. С другой стороны скорость метаболизма антипирина у пожарных 2-й группы может быть ниже, чем в других группах, а, значит, существенная часть метаболитов выводилась после 24 часового сбора мочи.

Проблема исключения влияния возраста, индекса массы тела, курения и группы (на основании времени проявления синдрома комплекса), как независимых признаков, на связь между показателями антипиринового теста и основными конгенерами диоксинов была решена для 51 пожарного с помощью многофакторного регрессионного анализа (в расчеты включены анализы диоксинов, выполненные в 1998 – 2002 гг. в Башкирском республиканском научно-исследовательском экологическом центре под руководством д.б.н. З.К. Амировой). Результаты анализа указывают на то, что суммарный TEQ является значимым прогностическим признаком для ЗНМАР как при абсолютном, так и относительном представлении данных:  $p = 0,026$  и  $0,034$ , соответственно. Обратная связь между 4НАР, выраженного как % от суммы метаболитов АР, с суммарным TEQ ( $p = 0,005$ ) являлась следствием увеличения пропорции ЗНМАР в сумме метаболитов антипирина. При этом основные группы конгенов диоксинов, ПХДД, ПХДФ и ПХБ, не оказывали значимого влияния на зависимые признаки, которыми выступали метаболиты АР. Единственным исключением явилась значимость ПХБ (с обратным знаком) для 4НАР, выраженного в % от суммы метаболитов АР.

На последнем этапе были проанализированы результаты оценки экспрессии диоксинчувствительных генов для 20-ти пожарных, распределенных в зависимости от уровня воздействия диоксинов в три подгруппы, сформированные на основании величины суммарного TEQ: низкий – 27,2 – 85,1 ( $n = 6$ ), средний – 85,2 – 152,4 ( $n = 7$ ) и высокий – 152,5 – 476,5 ( $n = 7$ ) пг/г липидов сыворотки крови.

Среди более экспонированных пожарных отмечена большая инвалидизация, они имели больший индекс массы тела, чем пожарные с низким уровнем

суммарного TEQ. Равномерный характер распределения курящих и некурящих пожарных между тремя подгруппами уменьшал вероятность того, что курение помешает установить связь между суммарным TEQ и экспрессией генов. Была оценена экспрессия AhR, CYP1A1 и CYP1B1 в трех подгруппах относительно суммарного TEQ, 1,2,3,7,8-пентахлордибензо-*p*-диоксина (ПeXДД), суммы ПХДФ и копланарных ПХБ. При этом были выявлены статистически значимые различия только для CYP1B1 и ПeXДД ( $p = 0,016$ ). Экспрессия AhR была на грани статистической значимости, когда воздействие выражалось в виде суммарного TEQ ( $p = 0,056$ ). ПeXДД имеет период полувыведения около 16 лет [15] и поэтому может быть более информативным индикатором отдаленного воздействия и взаимосвязи между уровнем диоксинов в сыворотке и индукцией генов. Предварительный анализ результатов свидетельствует, что это возможно.

В таблице 3 представлены результаты корреляционного анализа для 54 пожарных, у которых был проведен антипириновый тест и оценивалась экспрессия генов, чувствительных к воздействию диоксинов.

Как следует из таблицы, показана высокая степень взаимной корреляции между всеми изученными показателями, в том числе, между абсолютным содержанием ЗНМАР и показателями генной экспрессии. Некоторое исключение составила связь между CYP1B1 и ЗНМАР, которая была на границе статистической значимости ( $p = 0,051$ ). Выявление корреляции AhR и CYP1A1 с ЗНМАР принципиально, поскольку оба фермента (CYP1A1 и CYP1A2) относятся к одному семейству цитохромов P450 и имеют одинаковый механизм индукции диоксинами.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование содержания диоксинов в липидах сыворотки крови произвольно выбранных пожарных, участвовавших в ликвидации названного пожара, позволило заключить, что мы имеем дело с уникальной высокоэкспонированной диоксинами когортой. Установлена высокая степень

**Таблица 3**  
**Корреляция между показателями экспрессии диоксинчувствительных генов<sup>2</sup> и активностью CYP1A2 (ЗНМАР)**

Показатель		n = 54	
		r	p
AhR	ЗНМАР <sup>1</sup>	0,295*	0,030
AhR	CYP1A1	0,401*	0,003
AhR	CYP1B1	0,497*	0,000
CYP1A1	ЗНМАР <sup>1</sup>	0,359*	0,008
CYP1A1	CYP1B1	0,410*	0,002
CYP1B1	ЗНМАР <sup>1</sup>	0,267	0,051

**Примечание:** <sup>1</sup>ЗНМАР в процентах от АР дозы; <sup>2</sup>экспрессия генов AhR, CYP1A1 и CYP1B1 выражена в относительных единицах; r – приведены значения коэффициентов корреляции Спирмена, \* –  $p < 0,05$ .

корреляции между компонентами сигнального пути диоксинов, представленного как экспрессией диоксинчувствительных генов — AhR, CYP1A1 и CYP1B1, так и активностью CYP1A2, оцененной метаболическим тестом с антипирином. Воздействие диоксинов модифицировало сигнальные пути, о чем свидетельствует корреляция суммарного токсического эквивалента диоксинов ( $TEQ_{\text{ПХДД} + \text{ПХДФ} + \text{ПХБ}}$ ) с активностью цитохрома P4501A2, а также связь содержания пентахлордибензо-*p*-диоксина (1,2,3,7,8-ПeXДД) в липидах сыворотки крови с экспрессией CYP1B1.

В отличие от других известных профессионально экспонированных когорт пожарные подверглись воздействию диоксинов в составе сложного комплекса токсических веществ. К настоящему времени у значительной части пожарных выявлены нарушения здоровья в виде синдрома комплекса, включающего энцефалопатию, полиневропатию с вегетативными нарушениями конечностей, сосудистые нарушения. Очевидно, что названные нарушения обусловлены воздействием совокупности образовавшихся при пожаре химических веществ. Учитывая механизм токсического действия диоксинов, можно предположить, что ведущие компоненты образовавшегося комплекса существенно не модифицировали реализацию их патогенных свойств. С другой стороны один из возможных механизмов диоксинсвязанных изменений генной экспрессии проявился в усилении токсичности других химических соединений, например, полициклических ароматических углеводородов.

Полученные данные о высоких уровнях диоксинов в организме обследованных пожарных предполагают возможность профессионального воздействия. Такие уровни и коррелирующие с ними изменения системы биотрансформации ксенобиотиков являются основанием для регулярно диспансерного наблюдения за данной когортой пожарных с целью выявления и минимизации отдаленных эффектов диоксинов. Принципиально, что оценка состояния системы биотрансформации ксенобиотиков учитывает индивидуальную чувствительность к воздействию диоксинов и, тем самым, существенно дополняет результат анализа на их содержание в организме. А особенности биотрансформации и реализации токсического действия диоксинов обосновывают возможность применения такого подхода, несмотря на прошедшее с момента пожара время.

Результаты представленных исследований являются первым шагом к пониманию роли диоксиноподобных соединений в наблюдаемых нарушениях здоровья у пожарных, имеют важное прогностическое значение (например, в плане риска развития онкопатологии), а также служат основой для регистрации новых форм профессиональных заболеваний, характеризующихся значительным латентным периодом после воздействия.

Авторы выражают благодарность всем сотрудникам института и клиники, оказавшим содействие и помощь в проведении обследования. Осо-

бая благодарность Мериновой А.П. (участник проекта), д.м.н. Лахману О.Л., д.м.н. Маторовой Н.И., к.м.н. Кудаевой И.В., Скорняковой Г.В. (АФ НИИ МТ и ЭЧ), д.х.н. Бродскому Е.С., к.х.н. Мир-Кадыровой Е.Я., к.х.н. Фешину Д.Б., Жильникову В.Г. (Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Москва), Верещагину А.Л. (Лимнологический институт СО РАН, Иркутск), Хисматулину Р.А. (ИООО Союз пожарных инвалидов и пострадавших при исполнении служебных обязанностей, Иркутск), Уханову И.П. (Фонд пожарной безопасности по Иркутской области), Сапожнику А.А. (УГПС МЧС России Иркутской области), Зыряновой Н.Ю. (поликлиника-стационар УВД по Иркутской области).

*Работа выполнена при поддержке Американского фонда гражданских исследований и развития (CRDF), грант RB1-2375-AN-02.*

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Диоксины и здоровье человека: Научные основы выявления диоксиновой патологии / С.П. Поздняков, В.С. Румак, Г.А. Софронов, Н.В. Умнова. — СПб.: Наука, 2006. — 274 с.
2. Дифференциальный диагноз токсической энцефалопатии у пожарных / Е.В. Катаманова, В.Г. Колесов, О.Л. Лахман и др. // Бюлл. ВСНЦ СО РАМН. — 2002. — № 3. — С. 84—87.
3. Определение энзиматической активности цитохрома P4501A2 у «шелеховских» пожарных / Ю.И. Черняк, Н.И. Портяная, А.П. Меринова и др. // Токсикол. вестн. — 2002. — № 2. — С. 5—10.
4. Оценка состояния 2-й фазы биотрансформации ксенобиотиков у пожарных, принимавших участие в тушении пожара на АО «Иркутсккабель» / Ю.И. Черняк, Н.И. Портяная, Н.А. Шульгина и др. // Мед. труда и пром. экология. — 2003. — № 3. — С. 39—42.
5. Психопатологические проявления отдаленного периода профессиональных нейротоксикаций / В.Г. Колесов, В.А. Мещерягин, О.Л. Лахман, О.И. Шевченко // Ж. невролог. и психиатр. — 2005. — Т. 105, № 1. — С. 25—29.
6. Русанова Д.В. Электронейромиография в диагностике поражения периферической нервной системы у ликвидаторов пожара в г. Шелехов / Д.В. Русанова, О.Л. Лахман // Бюлл. ВСНЦ СО РАМН. — 2001. — № 2 (16). — С. 85—87.
7. Antipyrine as a probe for human oxidative drug metabolism: Identification of the cytochrome P450 enzymes catalyzing 4-hydroxyantipyrine, 3-hydroxymethylantipyrine, and norantipyrine formation / G. Engel, U. Hofmann, H. Heidemann et al. // Clin. Pharmacol. Ther. — 1996. — Vol. 59, № 6. — P. 613—623.
8. Antipyrine metabolism in firefighters participating in the 1992 «Irkutskcable» factory fire in Shelekhov, Russia / Y.I. Chernyak, J.A. Grassman, A.P. Merinova et al. // Organohalogen Comp. — 2005. — Vol. 67. — P. 2422—2426.
9. Assessment of serum PCDD, PCDF and PCB levels in firefighters exposed to combustion products

during the 1992 «Irkutskcable» factory fire in the city of Shelekhov, Russia / Y. Chernyak, J. Grassman, E. Brodsky et al. // *Ibid.* — 2004. — Vol. 66. — P. 2509–2515.

10. Birnbaum L.S. The mechanism of dioxin toxicity: relationship to risk assessment / L.S. Birnbaum // *Environ. Health Perspect.* — 1994. — Vol. 102, Suppl. 9. — P. 157–167.

11. Blood and adipose tissue collection protocols / D.G.Jr. Patterson, S.G. Isaacs, L.R. Alexander et al. // *Environmental Carcinogens Methods of Analysis and Exposure Measurement*. Vol. 11. Polychlorinated dioxins and Dibenzofurans. IARC Scientific Publication № 108, World Health Organization, 1991.

12. Denison M.S. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals / M.S. Denison, S.R. Nagy // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* — 2003. — Vol. 43. — P. 309–334.

13. Dioxin exposure and gene expression in firefighters / J.A. Grassman, Y.I. Chernyak, A.P. Merinova et al. // *Organohalogen Comp.* — 2006. — Vol. 68. — P. 2128–2131.

14. Dioxin exposure in a residential community / K.J. Orloff, D. Hewitt, S. Metcalf et al // *J. Exposure Anal. Environ. Epidemiol.* — 2001. — Vol. 11. — P. 352–358.

15. Elimination of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in occupationally exposed persons / D. Flesch-Janys, H. Becher, P. Gurn et al. // *J. Toxicol. Environ. Health.* — 1996. — Vol. 47. — P. 363–378.

16. Inhibition and induction of human cytochrome P450 (CYP) enzymes / O. Pelkonen, J. Mnenpaa, P. Taavitsainen et al. // *Xenobiotica.* — 1998. — Vol. 28, № 12. — P. 1203–1253.

17. Marlowe J.L. Aryl hydrocarbon receptor, cell cycle regulation, toxicity, and tumorigenesis / J.L. Marlowe, A. Puga // *J. Cell. Biochem.* — 2005. — Vol. 96. — P. 1174–1184.

18. Pharmacokinetics of TCDD in veterans of Operation Ranch Hand: 10-year follow-up / J.E. Michalek, J.L. Pirkle, S.P. Caudill et al. // *J. Toxicol. Environ. Health.* — 1996. — Vol. 47. — P. 209–220.

19. Serum dioxin levels in former chlorophenol workers / J.J. Collins, R.A. Budinsky, C.J. Burns et al. // *J. Exp. Sci. Environ. Epidemiol.* — 2006. — Vol. 16. — P. 76–84.

20. Sharer J.E. Identification of the human hepatic cytochrome P450 involved in the in vitro oxidation of antipyrine / J.E. Sharer, S.A. Wrighton // *Drug Met. Disposit.* — 1996. — Vol. 24, № 4. — P. 487–494.