

УДК 504.75.05

**Голощупов А.П.<sup>1</sup>, Соцкова В.А.<sup>2</sup>**<sup>1</sup>Уфимский государственный нефтяной технический университет<sup>2</sup>Городская поликлиника № 1 (г. Стерлитамак)

## **ЭНЗИМОДИАГНОСТИКА ПАТОХИМИЧЕСКИХ СДВИГОВ В БИОСРЕДАХ ДЕТЕЙ, ПРОЖИВАЮЩИХ В ПРОМЫШЛЕННОМ РЕГИОНЕ**

*Аннотация.* Обследовано 110 детей 7–11-летнего возраста 1-й и 2-й групп здоровья, проживающих в двух районах с разной техногенной нагрузкой. Исследовалась свободная активность ферментов плазмы крови и мочи, ассоциированных с микросомами и лизосомами. В плазме крови у детей происходит повышение активности малатдегидрогеназы (маркерный фермент митохондрий) и щелочной фосфатазы (индикаторный фермент микросом и показатель экскреторной функции гепатоцитов) при одновременном увеличении активности в моче ацетилэстеразы и  $\beta$ -галактозидазы, что свидетельствует о лабильности мембран соответствующих субклеточных структур, приводящей к развитию цитопатогенного эффекта. Установлено, что под действием промышленных выбросов у детей младшего школьного возраста создаются условия для повреждения биологических мембран.

*Ключевые слова:* донозологическая диагностика, малатдегидрогеназа, щелочная фосфатаза, ацетилэстераза и  $\beta$ -галактозидаза.

**A. Goloschapov<sup>1</sup>, V. Sotsckova<sup>2</sup>**<sup>1</sup>Ufa State Oil Technical University<sup>2</sup>City polyclinic No 1, Sterlitamak

## **ENZYMEDIAGNOSTICS OF PATHOCHEMICAL SHIFTS IN BIOMEDIUMS OF CHILDREN LIVING IN THE INDUSTRIAL REGION**

*Abstract.* We have examined 110 children at the age from 7 to 11 of the 1st and 2nd health groups who live permanently in two districts with different technogenic stress levels. The free activity of enzymes of blood plasma and urine localized in microsomes and lisosomes is investigated. The activity of malate dehydrogenase (mitochondrial enzyme) and alkaline phosphatase (microsomal enzyme and an indicator excretory functions of hepatocytes) in blood plasma of children is found to increase with increasing the activity of urine acetylerase and  $\beta$ -galactosidase, which indicates labilization of membranes of corresponding subcellular structures leading to development of a cytopathic effect. It is established that industrial plant emissions contribute to biological membrane damaging among the children of the lower school age.

*Key words:* donosological status, malate dehydrogenase, alkaline phosphatase, acetylerase,  $\beta$ -galactosidase.

Экологическая ситуация во многих промышленных городах Российской Федерации обуславливает повышенный риск развития патологических процессов прежде всего в детских контингентах. Известно, что детский организм обладает несовершенными адаптационными возможностями на фоне снижения сопротивляемости и резистентности [2, с.6; 4, с. 106; 14, р. 248]. Важная роль при оценке воздействия негативных экологических факторов отводится изучению предболезненных (донозологических) состояний в организме и установлению ранних индикаторов экопатогенного воздействия на субклеточном, клеточном и органном уровнях, с учетом влияния на мембранные комплексы клеток. При этом необходимо рассматривать возможность цитопатогенного действия комплекса неблагоприятных экологических факторов вследствие лабилизации (увеличения проницаемости) мембран субклеточных структур и «выхода» структурированных в органеллы и мембраны молекул ферментов во внеклеточное пространство [9, с. 20; 10, с. 25].

### Методика

Биохимическое исследование было проведено среди 110 детей 7-11 летнего возраста 1-й и 2-й групп здоровья (57 мальчиков и 53 девочки). Родители детей дали информированное письменное согласие на участие своих детей в исследованиях. Дети были разделены на две группы, различающиеся по месту проживания. Обследовалось 80 детей, обучающихся в школе-интернате № 1 г. Стерлитамака, расположенного в селитебной зоне городской за-

стройки вблизи промышленной зоны. Контрольную группу составили 30 детей, обучающиеся в среднеобразовательной школе пос. Шахтау, находящейся в 11 км от города. Данный район имеет благоприятное эколого-географическое положение с позиции среднегодовой розы ветров и не подвержен воздействию промышленных выбросов г. Стерлитамака. Спектрофотометрическим методом в плазме крови проводились исследования активности малатдегидрогеназы (МДГ) (КФ 1.1.1.37) [15, р. 64–65], щелочной фосфатазы (ЩФ) (КФ 3.1.3.1) с использованием наборов ЗАО «Вектор-Бест», в моче – ацетилэстеразы (АЭ) (КФ 3.1.1.6) [11, с. 1203–1205] и  $\beta$ -галактозидазы (ГАЛ) (КФ 3.2.1.23) [13, р. 559–572].

В основе метода определения МДГ лежит измерение интенсивности протекания ферментативной реакции окисления малата:  $\text{малат} + \text{НАД}^+ \leftrightarrow \text{оксалоацетат} + \text{НАДН} + \text{H}^+$ . Энзиматическую реакцию проводили в щелочной среде, что способствует сдвигу равновесия в сторону окисления яблочной кислоты. В лунку специального лабораторного планшета вносили микропипеткой последовательно: 40 мкл. плазмы, 40 мкл. 60 мМ раствора  $\text{НАД}^+$ , 120 мкл. 0,2 М глицин-NaOH буфера (рН 10,0) и 40 мкл. 1 М раствора L-малата натрия. Восстановленный НАД, образующийся при данной реакции, определялся количественно спектрофотометрическим методом при длине волны 340 нм.

### Результаты и обсуждение

Состояние митохондриальных мембран оценивали с использованием такого биохимического показателя, как

уровень активности свободной МДГ в плазме крови. Фермент локализован в матриксе митохондрий и участвует в качестве необходимого звена в реакциях цикла трикарбоновых кислот. Рост активности МДГ в крови, относительно базального уровня, свидетельствует о дестабилизации мембран митохондрий и повышении их проницаемости с «выходом» во внеклеточное пространство данного фермента.

В популяционных исследованиях с целью ранней диагностики гепатотропного и нефротоксического воздействия антропогенных факторов окружающей среды рекомендуется исследование активности мембраноструктурированных ферментов микросомальной фракции [6, с. 82]. С учетом данного обстоятельства, нами проводилось одновременное изучение активности свободной АЭ в моче и ЩФ в плазме крови. Повышенный уровень в биосредах указанных ферментов отражает изменения мембранных комплексов на уровне субклеточных структур

эндоплазматической сети (микросомальная фракция). Также проводили изучение активности в моче фермента матрикса лизосом – ГАЛ. Данный фермент целесообразно использовать в оценке повреждающего действия антропогенных факторов на субклеточные структуры – лизосомы, и, соответственно, оценивать органоспецифический цитопатогенный эффект этих воздействий [8, с.61].

Установлено (табл. 1), что активность свободной МДГ у детей, проживающих в городе, превышала контрольные значения более чем в 1,5 раза, в то время как в контрольной группе значения этого показателя оставались в пределах нормы (рис. 1). Активность данного фермента превосходила верхнюю границу нормы для данного параметра (0,42-0,53 мкмоль/мл/мин) у 59 % обследованных детей из опытной группы [9, с.20]. В группе контроля значения данного показателя оставались в пределах референтных значений.

Таблица 1

**Активность малатдегидрогеназы и щелочной фосфатазы в плазме крови детей основной и контрольной групп, мкмоль/мл/мин**

Показатели	Группы детей		t <sub>st</sub>	P
	Контрольная (n=30)	Основная (n=80)		
Малатдегидрогеназа,	0,45 ± 0,01	0,76 ± 0,01	17,22	< 0,001
Щелочная фосфатаза	0,22 ± 0,01	0,30 ± 0,01	5,37	< 0,001

Полученные результаты свидетельствуют об увеличении проницаемости и дестабилизации мембран митохондрий с выходом МДГ в кровь, а также о нарушении общих катаболических процессов энергопродукции в митохондриальном матриксе, с вовлечением

реакций цикла лимонной кислоты [9, с.20; 10, с.25]. Также установлено статистически достоверное (P < 0,001) увеличение в 1,4 раза активности в плазме крови ЩФ – маркерного фермента мембран эндоплазматического ретикула (микросом) в основной группе детей

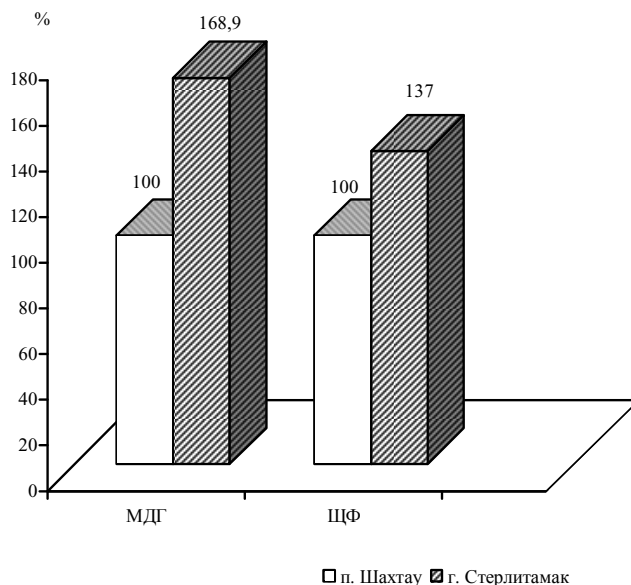


Рис. 1. Активность МДГ и ЩФ в плазме крови у детей контрольной и основной групп

относительно контрольной. Чаще всего активация данного фермента в крови отражает нарушения целостности гепатоцитов и функционального статуса гепатобилиарной системы [6, с. 84]. Таким образом, повышенный уровень активности ЩФ в плазме крови («выход» в биосреду фермента, структурированного в мембраны) отражает процессы дестабилизации эндоплазматических мембран, приводящие к развитию неспецифического цитопатогенного эффекта, с вовлечением в патологический

процесс мембранных структур специализированных клеток-гепатоцитов и, в конечном счете, основного органа, осуществляющего детоксикацию ксенобиотиков – печени.

Одновременно в тех же группах детей в моче определяли показатели активности ацетилэстеразы и  $\beta$ -галактозидазы (табл. 2). Уровни активности данных ферментов мочи в основной группе детей были достоверно выше аналогичных показателей в контрольной группе.

Таблица 2

**Активность ацетилэстеразы и  $\beta$ -галактозидазы в моче детей основного и контрольного районов, нмоль/мл/мин**

Показатели	Группы детей		$t_{st}$	P
	Контрольная (n = 30)	Основная (n = 80)		
Ацетилэстераза	30,5 ± 1,8	49,3 ± 1,7	2,46	< 0,02
$\beta$ -галактозидаза	2,22 ± 0,10	2,55 ± 0,07	2,69	< 0,01

Повышение в моче ферментативной активности маркерного фермента микросомальной фракции – АЭ у детей основной группы, по сравнению с показателями контрольной группы, а также с верхней границей нормы (15-25 нмоль/мл/мин) [9, с.19], свидетельствует о структурной дестабилизации мембран микросом, и, вероятно, является свидетельством индукции процессов микросомальных окислительных реакций в почечной ткани. Вполне вероятно, что подобная активация микросомального окисления вызывается веществами-индукторами, например водорастворимыми ксенобиотиками, выводимыми с мочой, а также токсическими веществами липофильной природы, которые подвергаются частичной модификации в органах детоксикации (легкие, кишечная стенка, почки, печень), приобретая при этом гидрофильные свойства.

Также было установлено, что у подавляющего числа детей (95%), проживающих в индустриальном городе, был превышен верхний предел нормативных колебаний активности АЭ в моче; доля детей с превышением границы нормы данного показателя в группе контроля составила 30%. Статистический анализ активности ацетилэстеразы в основной группе детей (г. Стерлитамак) показал почти 2-кратное превышение верхнего значения референтной нормы по показателю медианы (рис. 2), что может свидетельствовать о лабилизации микросомальных мембран клеток тубулярного эпителия нефрона и «выходе» в цитозоль и в мочу структурированного в микросомальные мембраны фермента, а также об активации микросомального окисления, вызываемого растворимыми в воде ксенобиотиками.

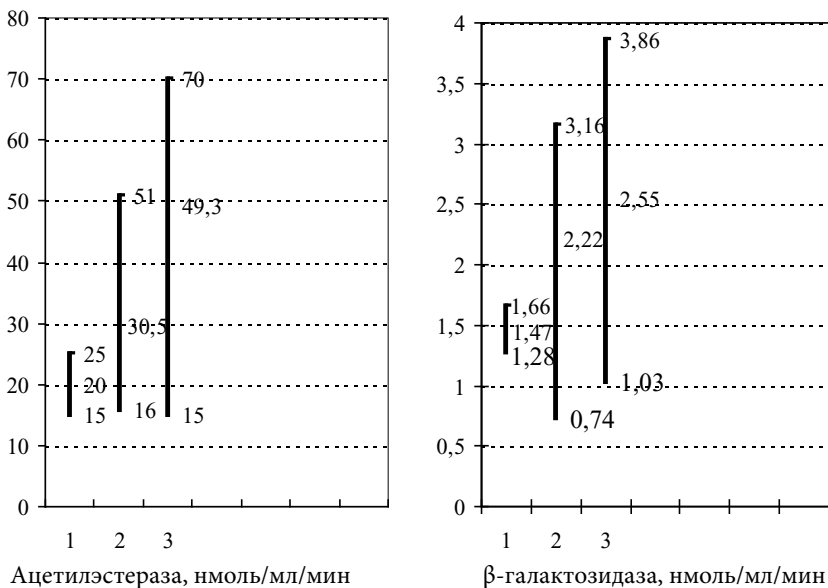


Рис. 2. Активность ферментов в моче (медиана и пределы колебаний): 1 –литературные данные, 2 –контрольная группа, 3 –основная группа.

На наш взгляд, двукратное повышение активности АЭ в основной группе детей по сравнению с верхней границей нормы обусловлено хроническим неблагоприятным воздействием факторов среды промышленного города. Это воздействие, по-видимому, в меньшей степени выражено в контрольном (пригородном) районе. В целом высокие уровни свободной активности АЭ в моче детей свидетельствуют о выраженной нагрузке ксенобиотиками на детский организм, а также о возможном нефротоксическом действии факторов городской среды (индукция микросомальных ферментов).

Описанные сдвиги биохимических показателей свидетельствуют о хроническом неблагоприятном нефротоксическом воздействии антропогенных факторов. В пользу данного заключения свидетельствует повышенное содержание молекул средней массы в крови и частое выявление нефропатологии во всех возрастных когортах популяции г. Стерлитамака, особенно в группах жителей проживающих в селитебной зоне, расположенной вблизи северной промышленной зоны [5, с. 26]. Молекулы средней массы являются белковыми токсинами и представляют собой продукты деградации белков с молекулярной массой 300-5000 Д. Они отвечают за возникновение местных патологических эффектов эндогенной интоксикации при возникновении многих видов патологий, например, при почечной недостаточности [3, с.138-140; 7, с. 4-8].

В моче у детей, проживающих в зоне воздействия химического комплекса г. Стерлитамака, установлено повышение активности и другого фермента матрикса лизосом –  $\beta$ -галактозидазы.

Это подтверждает заключение о деструктивном действии антропогенных факторов на биомембраны, которое было установлено в результате исследования активности ацетилэстеразы. Повышенная активность фермента объясняется лабилизацией лизосомальных мембран тубулярного эпителия почек [1, с. 12; 16, р. 261] и поступлением ферментов во вторичную мочу в результате хронического воздействия агрессивных химических факторов, активирующих процессы свободнорадикального окисления в различных тканях.

### Выводы

Таким образом, для оценки нефротоксического действия антропогенных факторов среды индустриального города в качестве чувствительных биохимических индикаторов неспецифической резистентности целесообразно определять свободную активность АЭ и ГАЛ в моче. Молекулы ферментов высвобождаются из соответствующих органелл в результате лабилизации мембран микросом и лизосом, соответственно. К характерным особенностям метаболических изменений можно также отнести сдвиги исследованных биохимических параметров неспецифической резистентности на фоне повышенной выработки активных форм кислорода и других радикалов, усиления прооксидантной активности, образования продуктов липопероксидации при дисбалансе антирадикальной защиты.

Также повышается вероятность дестабилизации и увеличения проницаемости биомембран с нарушением их структурно-функциональной организации, что может приводить к «вы-

ходу» во внеклеточное пространство и биосреды (моча, кровь) крупных белковых молекул, например, энзимов, локализованных в таких субклеточных структурах, как эндоплазматический ретикулум (микросомы), лизосомы и митохондрии.

Несомненно, что при этом важнейшие органы выделения и детоксикации ксенобиотиков (почки и печень) подвергаются и наибольшему воздействию. О негативном влиянии антропогенных факторов окружающей среды на органы выделения свидетельствуют повышенные уровни содержания молекул средней массы в периферической крови и активизация в моче ацетилэстеразы и  $\beta$ -галактозидазы – энзимов тубулярного эпителия нефрона. Об аналогичном действии на печень свидетельствует повышение в плазме крови активности щелочной фосфатазы.

В работе В.П. Савина и Н.П. Сетко [12, с. 26] рассматривались вопросы влияния выбросов нефтехимических предприятий в атмосферу на здоровье детей-школьников. Авторы описали и выделили ряд предпатологических нарушений здоровья на основе корреляционного анализа взаимозависимостей гематологических, энзимохимических и антропометрических показателей. Авторы отнесли ряд выявленных отклонений, таких как дезорганизация ферментативной активности в лейкоцитах (кислая и щелочная фосфатазы, цитохромоксидаза), лабилизация лизосомальных мембран в этих клетках, наряду с изменениями свертываемости крови и эритроцитарной системы, возникновение соматических диспропорций – к предпатологическим нарушениям.

Таким образом, у детей, проживающих в условиях высокой антропогенной нагрузки, создаются условия для повреждения биомембран, нарушения их естественной микроархитектоники и функциональных характеристик с повышенным «выходом» во внеклеточное пространство ферментов субклеточных структур. В плазме крови у детей происходит повышение активности малатдегидрогеназы (маркерный фермент митохондрий) и щелочной фосфатазы (индикаторный энзим микросом и показатель экскреторной функции гепатоцитов) при одновременном увеличении активности в моче ацетилэстеразы и  $\beta$ -галактозидазы, что свидетельствует о лабилизации мембран соответствующих субклеточных структур и приводит к развитию цитопатогенного эффекта.

#### ЛИТЕРАТУРА:

1. Бабаева Н.И., Липицкая И.Я., Творогова М.Г. Диагностическое значение исследования активности N-ацетил- $\beta$ -D-глюкозаминидазы в моче (обзор литературы) // Лабораторное дело. – 1991. – № 1. – С. 9–16.
2. Вельтищев Ю.Е. Экологически детерминированная патология детского возраста // Российский Вестник перинатологии и педиатрии. – 1996. – № 2. – С. 5–12.
3. Габриэлян Н.И., Липатова В.И. Опыт использования показателя средних молекул в крови для диагностики нефрологических заболеваний у детей // Лабораторное дело. – 1984. – № 3. – С. 138–140.
4. Гичев Ю.П. Загрязнение окружающей среды и здоровье человека (печальный опыт России). – Новосибирск: СО РАМН, 2002. – 230 с.
5. Даутов Ф.Ф., Тагиров Ш.Х., Галиев Р.Х. Заболеваемость населения пиелонеф-

- ритами на территориях с разным уровнем техногенной нагрузки // Гигиена и санитария. – 2002. – № 1. – С. 25–27.
6. Долинская С.И. Сравнительная характеристика функционального состояния ферментов систем эндоплазматического ретикулума при действии химических загрязнителей окружающей среды // Структурно–функциональные и биохимические механизмы влияния факторов окружающей среды на организм человека и экспериментальных животных. – М.: Медицина, 1986. – С. 82–88.
  7. Карякина Е.В., Белова С.В. Молекулы средней массы как интегральный показатель метаболических нарушений (обзор литературы) // Клиническая лабораторная диагностика. – 2004. – № 3. – С. 4–8.
  8. Коганова З.И. Оценка адаптационных возможностей организма детей Магнитогорска по активности некоторых ферментов детоксикации / З.И. Коганова, Ф.И. Ингель, Т.Б. Легостаева и др. // Гигиена и санитария. – 2010. – № 3. – С. 58–63.
  9. Меркурьева Р.В. К обоснованию нормативных уровней некоторых биохимических показателей на примере детей 7–8 лет / Р.В. Меркурьева, Н.Т. Лебедева, Н.Н. Шпилевский и др. // Гигиена и санитария. – 1985. – № 11. – С. 19–20.
  10. Мухамбетова Л.Х. Разработка биохимических подходов к оценке влияния на организм ксенобиотиков // Гигиена и санитария. – 2004. – № 6. – С. 24–26.
  11. Покровский А.А., Арчаков А.И. Определение активности ацетилэстеразы по А.А. Покровскому, А.И. Арчакову // Современные методы в биохимии. – М.: Медицина, 1968. – С. 1203–1205.
  12. Савин В.П., Сетко Н.П. Гигиенические аспекты здоровья детей, проживающих в районах с развитой газохимической промышленностью // Гигиена и санитария. – 1996. – № 4. – С. 24–27.
  13. Kresse H. Enzymic diagnosis of the genetic mucopolysaccharide storage disorders / H. Kresse, K. von Figura, U. Klein et al. // Methods Enzimol. – 1982. – Vol. 83. – P. 559–572.
  14. Silbergeld E.K. Neurochemical approaches to developing biochemical markers of neurotoxicity: review of current status and evaluations of future prospects // Environmental research. – 1993. – Vol. 63 (№ 2). – P. 247–286.
  15. Wolge R.Y., Neilands J.B. Some molecular and kinetic properties of heart malic dehydrogenase // J.Biol.Chem. – 1956. – Vol. 221. – P. 61–70.
  16. Yoshida M. Elevation of the Neurotoxicity of Aromatic Nitro–Amino Compounds by Urinary Enzyme Activities / M. Yoshida, H. Yoshikawa, H. Goto et al. // J. of Toxicol. Scien. – 1989. – Vol. 14 (№ 4). – P. 257–268.