



Therapia

український медичний гідник

ISSN 1990-6617

Засновано у січні 2006 року

Виходить 12 разів на рік

- **Українська кардіохірургія:
для лікарів та пацієнтів**
- **Отравление Виктора Ющенко
2, 3, 7, 8-тетрахлордибензо-
п-диоксином (ТХДД):
выявление и количественное
определение метаболитов ТХДД**
- **Экстренная контрацепция:
 достижения и проблемы**

9 (39) 2009

Отравление Виктора Ющенко 2, 3, 7, 8-тетрахлордибензо- п-диоксином (ТХДД): выявление и количественное определение метаболитов ТХДД¹

O. Sorg, M. Zennegg, P. Schmid, R. Fedosyuk, R. Valikhnovskyi, O. Gaide, V. Kniazevych, J-H. Saurat

Резюме

Предпосылки. 2, 3, 7, 8-Тетрахлордибензо-п-диоксин (ТХДД) обладает длительным периодом полувыведения у человека (5–10 лет) вследствие высокой липофильности, а также слабого или полного отсутствия метаболизма. Мы мониторировали ТХДД, его форму, распределение и элиминацию из организма Виктора Ющенко после тяжелого отравления.

Методы. В конце декабря 2004 г. у пациента обнаружено отравление ТХДД; уровни в сыворотке крови (108 тыс. пг/г липидной массы) были в 50 тыс. раз выше, чем в общей популяции. Мы выявили ТХДД, а также его метаболиты и мониторировали их уровень в течение 3 лет с помощью методов газовой хроматографии и масс-спектрометрии высокого разрешения в образцах сыворотки крови, жировой ткани, фекалий, кожи, мочи и пота после их извлечения и очистки с помощью различных органических растворителей.

Выводы. Содержание немодифицированного ТХДД в проанализированных образцах составляло приблизительно 60% от ТХДД, элиминированного из организма в течение того же периода. Два метаболита ТХДД — 2,3,7-трихлор-8-гидроксибензо-п-диоксин и 1,3,7,8-тетрахлор-2-гидроксибензо-п-диоксин были выявлены в фекалиях, сыворотке крови и моче. Фекалии содержали наибольшую концентрацию метаболитов ТХДД и были главным путем элиминации. В общей сложности на различные пути элиминации ТХДД и его метаболитов приходилось 98% выведения токсина из организма. Период полувыведения ТХДД у нашего пациента составил 15,4 мес.

Интерпретация. Этот случай отравления ТХДД указывает на то, что разработка методов рутинной оценки метаболитов ТХДД у человека должна стать главной целью исследования ТХДД в эру метаболомики².

Введение

«Если нет никакого яда, не может быть отравления, и нет каких бы то ни было его следов» [1]. Это высказывание демонстрирует господствующую геополитическую и юридическую ситуацию, которая отрицательно сказалась на научном исследовании, целью которого было выяснить, был ли отравлен Виктор Ющенко, кандидат в президенты на выборах в Украине в 2004 г. (рис. 1). Во время проведения своей предвыборной кампании он внезапно тяжело заболел (рис. 2.) в результате отравления во время приема пищи в Киеве 5 сентября 2004 г. [2, 3]. Однако выявление яда — чистого диоксина (2,3,7,8-ТХДД) — было отсрочено с 5 сентября 2004 г. до конца декабря 2004 г., поскольку в медицинской практике больного с признаками острого отравления не всегда

обследуют на наличие ТХДД. Поэтому неизвестно — определили бы яд в организме Виктора Ющенко судебно-медицинские эксперты, если бы он умер вследствие отравления.

ТХДД — наиболее сильнодействующий представитель группы полигалогенированных ароматических углеводородов, к которым относятся полихлорированные дibenzo-п-диоксины (ПХДД), полихлорированные дibenзофураны (ПХДФ) и полихлорированные бифенилы [4, 5]. Эти липофильные соединения свободно дифундируют через клеточные мембранны и проявляют свои плейотропные³ биологические эффекты путем связывания с внутриклеточными рецепторами ароматических углеводородов [6, 7]. Их токсические эффекты, особенно у ТХДД, вызваны высоким средством к указанному типу рецепторов

¹ Перепечатано с сайта www.thelancet.com 05.08.2009. Sorg O., Zennegg M., Schmid P., Fedosyuk R., Valikhnovskyi R., Gaide O., Kniazevych V., Saurat J-H. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) poisoning in Victor Yushchenko: identification and measurement of TCDD metabolites. DOI:10.1016/S0140-6736(09)61027-8. С разрешения компании Elsevier (Прим. ред.).

² Метаболомика относится к группе новых наук (геномика, протеомика, транскриптомика), использующих современные достижения биоинформатики и биотехнологии. Основная задача метаболомики состоит в выявлении и количественном определении (с построением глобального профиля концентрации) всех метаболитов в данном образце клеток, тканей, органов и биологических жидкостей. Позволяет выявить метаболические изменения, характерные для инициации и развития патологического процесса, закономерности ответа метаболизма на терапию (фармакогеномика), воздействие токсинов (токсикогеномика), а также на различные пищевые продукты (нутриномика). Основные патологии, находящиеся в фокусе метаболомики, — метаболический синдром, сахарный диабет, заболевания сердечно-сосудистой системы и печени, обнаружение врожденных и наследственных нарушений метаболизма, а также метаболические процессы, связанные с заместительной почечной терапией и трансплантацией органов. Метаболомика основана на применении методов спектроскопии протонного ядерного магнитного резонанса в сочетании с компьютерным анализом распознавания образов (Прим. ред.).

³ Плейотропный — имеющий более одного генетического эффекта; приводящий ко множественной фенотипической экспрессии (Прим. ред.).



Рис. 1. Карта Украины

и их длительным периодом полувыведения. Поскольку полигалогенированные ароматические углеводороды липофильны, они накапливаются в липидах тканей на основе физических закономерностей путем простого распределения; этот процесс объясняет их медленную элиминацию с фекалиями. Только 17 (в том числе ТХДД) из 210 возможных ПХДД и ПХДФ имеют замещающие атомы хлора в боковых положениях, а именно в положениях атомов углерода 2, 3, 7 и 8, что, следовательно, предотвращает или существенно замедляет их биоконверсию в полярные метаболиты в процессе окисления ферментами I и II фаз. Эффективная биоконверсия путем ферментативного окисления может происходить тогда, когда доступны два соседних атома водорода, что невозможно в случае, если в боковых положениях находятся заместители — атомы хлора [8–10]. Хотя метаболизм ПХДФ может быть индуцирован как самим этим веществом, так и ТХДД [11, 12], в отношении ТХДД не была продемонстрирована индукция собственного метаболизма [13]. Было показано, что цитохромы P450 (CYP) — монооксигеназы CYP1A1, CYP1A2 и CYP1B1 значительно индуцированы у человека [14, 15], но наличие метаболитов ТХДД не было четко продемонстрировано до сих пор. Ожидаемый период полувыведения ТХДД колеблется от менее 5 лет у лиц, подвергшихся воздействию высоких уровней, то есть более 10 тыс. пг/г липидной массы ТХДД в сыворотке крови, до более чем 10 лет у подвергшихся воздействию в дозе менее 50 пг/г липидной массы [16].

В конце декабря 2004 г. нам был представлен пациент, который сильно пострадал от вероятного отравления ТХДД. Без общепризнанного протокола специфического лечения такого серьезного и мучительного патологического процесса существуют две возможных стратегии: непрерывное мониторирование яда, его формы, распределения и элиминации, либо поиск медицинских решений, основанных на молекулярной структуре, для поддержки органов, пострадавших от токсина. Мы сообщаем здесь о первой стратегии, потому что особое желание

пациента состояло в том, чтобы его случай послужил накоплению научных знаний о токсичности ТХДД.

Методы

Мы получили письменное согласие пациента на обнародование рецензированной научной информации о его случае. В начале января 2005 г. мы выявили ТХДД (108 тыс. пг/г липидной массы) в сыворотке крови нашего 50-летнего пациента, взятой в контролируемых условиях Geneva University Hospital, Швейцария (табл. 1), уровни ТХДД в которой превышали более чем в 50 тыс. раз таковые средние уровни ТХДД в общей популяции [17].

Подобные уровни были выявлены независимой лабораторией в пробе, взятой у того же пациента в середине декабря 2004 г. [18]. Фекалии пациента вначале были лиофилизированы после гомогенизации, а образцы плотных тканей (жировой ткани и кожи) заморожены в жидким азоте, а затем гомогенизированы путем растирания. Кровь, моча и пот подверглись заморозке. Мы экстрагировали и очистили все образцы с помощью различных органических растворителей, а затем проанализировали растворенные экстракты отдельно на наличие метаболитов ТХДД. Мы смешали образцы с 17 стандартными 2,3,7,8-хлорзамещенными ПХДД и ПХДФ, меченными изотопом углерода ¹³C, прежде чем измерили концентрации ТХДД и его метаболитов.



Рис. 2. Фотографии Виктора Ющенко до отравления (А), через 3 мес (Б) и 3,5 года (С) после отравления 2,3,7,8-ТХДД

Таблица 1. Концентрация (пг/г липидной массы (ЛМ) или пг/г полной массы (ПМ) ткани⁴) 2,3,7,8-ТХДД во времени (месяцы) после дня отравления в проанализированных образцах

	Сыворотка		Подкожная жировая клетчатка		Фекалии		Биопсия кожи		Материал, извлеченный из кожи		Pot	Mocha
	ЛМ*	ПМ	ЛМ	ПМ	ЛМ	ПМ	ЛМ	ПМ	ЛМ	ПМ	ПМ	ПМ
4,01	108000	860	89000	38000	—	—	7400	1200	116000	1400	—	5
5,19	68500	470	92000	66000	—	—	—	—	—	—	—	—
5,85	110000	720	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
6,64	81500	700	—	—	—	—	—	—	67000	2400	—	—
7,40	75750	680	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
9,40	73500	550	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
9,80	69 250	600	68000	50 000	—	—	21 000	1600	—	—	—	—
10,98	58 000	480	—	—	28 000	990	29 000	1150	58000	3500	—	—
12,66	57000	400	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
14,37	57750	390	47000	24000	—	—	—	—	14000	580	—	—
15,52	50000	390	—	—	—	—	51 000	9200	—	—	—	—
17,36	46750	400	48000	39000	—	—	—	2900	7900	520	—	—
18,67	47000	320	—	—	—	—	—	—	14000	240	—	—
20,74	47000	310	—	—	—	—	—	—	18000	270	—	—
22,42	—	—	—	—	9900	160	—	—	—	—	—	—
22,98	34500	260	39000	29000	11000	1100	39000	930	23000	1200	—	—
23,01	—	—	—	—	5900	200	—	—	—	—	4	—
23,08	—	—	—	—	10000	820	—	—	—	—	—	0,05
28,47	31 250	260	30500	19000	13000	135	—	—	—	—	—	0,03
30,77	28 000	230	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
34,12	25 750	180	28750	23000	—	—	—	—	—	—	—	—
39,25	20 500	160	23000	11000	3800	460	—	160	19000	330	—	—

*Средние значения гравиметрического анализа и анализа крови.

Поскольку только уровни ТХДД, а не других 16 хлорированных соединений, относящихся к тому же классу, у пациента были выше, чем в общей популяции, в последующих анализах мы измеряли только концентрацию ТХДД. Мы использовали методы газовой хроматографии и масс-спектрометрии высокого разрешения для выявления и количественной оценки ТХДД и его возможных метаболитов в образцах. Наличие возможных метаболитов ТХДД было исследовано на основании указанных Van den Berg и коллегами [5] прогнозов и выявлено путем анализа четырех наиболее часто встречающихся сиг-

налов изотопного распределения хлора в пределах предполагаемых кластеров молекулярных ионов в выбранном режиме ионного мониторинга в процессе газовой хроматографии и масс-спектрометрии высокого разрешения. Поскольку эталонные стандарты гидроксилированных дибензо-п-диоксинов не были коммерчески доступны, мы использовали 3,3',4,5'-тетрахлор-4'-гидроксибифенил, меченный изотопом ¹³C (Cambridge isotope laboratories, Эндовер, Массачусетс, США), для количественной оценки возможных метаболитов. Данное соединение было выбрано потому, что оно структурно

⁴ Масса ткани, содержащая воду (Прим. ред.).

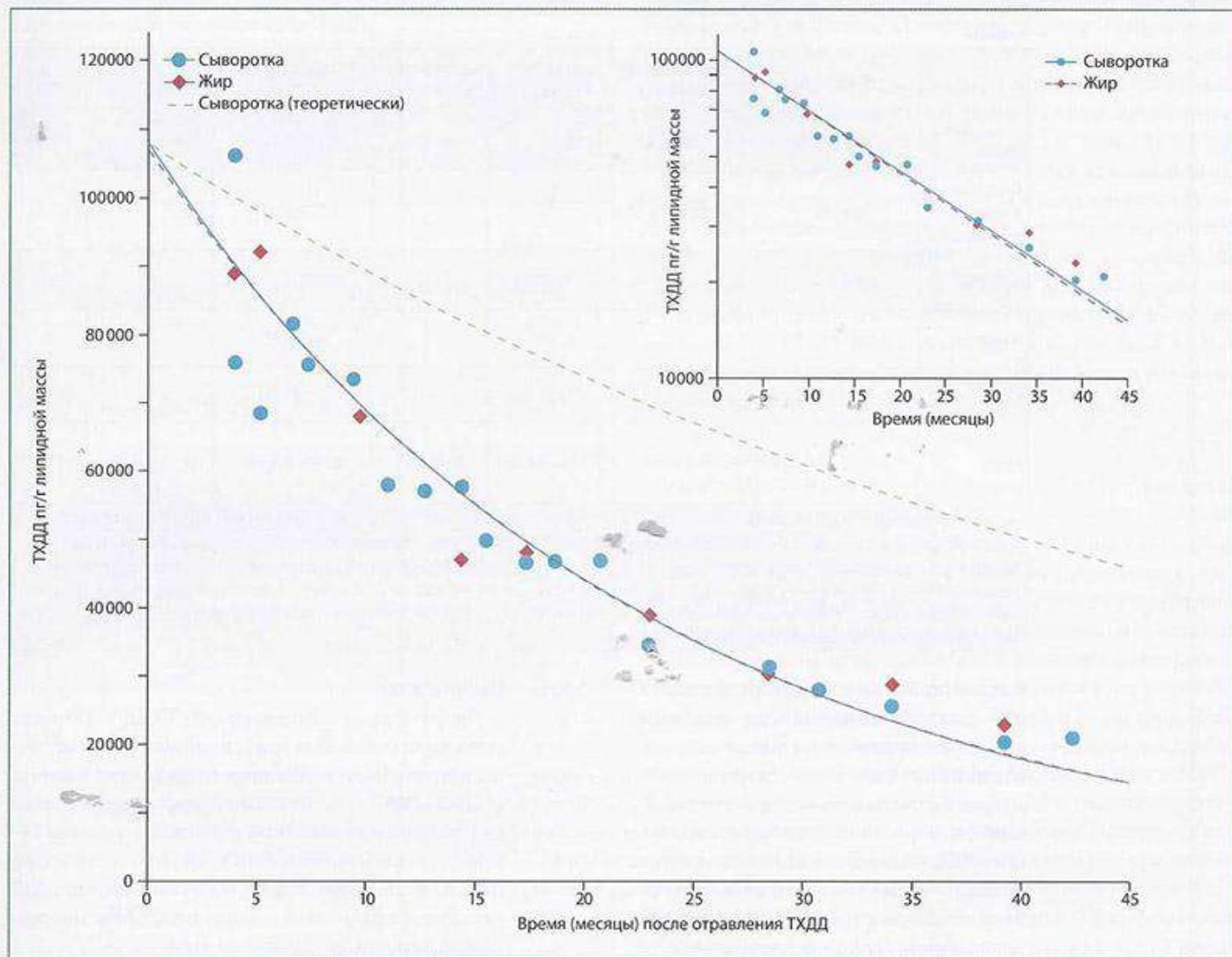


Рис. 3. Кривые выведения распада 2,3,7,8-ТХДД в липидах сыворотки и подкожной жировой клетчатки

Теоретическую кривую распада показано со значениями, указанными в отношении лиц, подвергшихся воздействию высоких уровней ТХДД (во вставленном графике ось у является логарифмической шкалой) [16]. Зеленая пунктирная линия представляет собой ожидаемую кривую распада для лиц, не подверженных риску воздействия ТХДД. В адаптированной формуле распад ТХДД в сыворотке крови ($(108\,000 \pm 6000)e^{-0.0449 \pm 0.005t}$), а в жировой ткани — $(107\,000 \pm 5000)e^{-0.0443 \pm 0.0035t}$ (ppt⁵).

аналогично гидроксилированным метаболитам ТХДД и имеет сходную структуру фрагментации в процессе электронной ионизации при масс-спектрометрии [19]. Трихлорметоксидибензо-п-диоксин и тетрахлорметоксидибензо-п-диоксин, которые были использованы в качестве эталонных соединений для метаболитов ТХДД, изготовили на месте, тогда как пять из шести возможных моногидрокситетрахлордибензо-п-диоксинов были заказаны. Липидное содержимое всех образцов было измерено гравиметрическим методом после испарения растворителя.

Формула 1 была использована для расчета распада ТХДД:

$$\text{ТХДД-концентрация}(t) = 110000(\text{ng/g липидов сыворотки})e^{-0.0445t}, \quad (1)$$

где t — время, выраженное в месяцах; концентрация ТХДД на момент отравления t_0 выражена в $\text{ng/g липидной массы}$; $e=2,71828$. Период полувыведения был рассчитан на основании формулы 1 — т. е. $\ln(2)/0.045=15.4$ мес. Мы использовали период 1 год

начиная с 11 мес после отравления с целью попытаться установить соотношение между кривыми распада ТХДД и различными путями элиминации ТХДД и выздоровления. Концентрации ТХДД в липидах в начале и в конце этого периода были рассчитаны с помощью формулы 1. Количество жира в организме пациента было рассчитано по формуле, представленной Gallagher и коллегами [20], что подтвердилось при анализе изображений, полученных методом компьютерной томографии.

Количество ТХДД, выделенного с фекалиями, мочой и потом в течение 12 мес анализов, было рассчитано с использованием формулы 2:

$$\Delta m = \int_0^t m \cdot e^{-Kt} \cdot dt = \frac{m}{K}(1 - e^{-12K}), \quad (2)$$

где dt — дифференциал времени; m — предполагаемое количество ТХДД, выделенного с фекалиями, мочой и потом в течение первого месяца, т. е. произведение концентрации ТХДД на

⁵ ppt (parts per trillion) — триллионная доля (Прим. ред.)

Таблица 2. Формулы для расчета концентрации 2,3,7,8-ТХДД, элиминированного из организма, и в образцах тканей во времени

	Формула	A (пг/г полной массы)	m_1 (мкг в месяц; СО)	m_2 (мкг в месяц; СО)	K_1 (мкг в месяц; СО)	K_2 (мкг в месяц; СО)	R^2
Сыворотка крови	$c(t)=Ae^{-K_1 t}$	940 (50)	—	—	0,053 (0,005)	—	0,883
Подкожная жировая клетчатка	$c(t)=Ae^{-K_1 t}$	61 000 (10 000)	—	—	0,036 (0,01)	—	0,674
Фекалии	$c(t)=m_1 e^{-K_1 t}$	—	10,9 (5)	—	0,042 (0,027)	—	0,563
Моча	$c(t)=m_1 e^{-K_1 t}$	—	0,18 (2)	—	0,043 (2)	—	*
Пот	$c(t)=m_1 e^{-K_1 t}$	—	0,21 (2)	—	0,043 (2)	—	*
МИК	$c(t)=m_1 e^{-K_1 t} - m_2 e^{-K_2 t}$	—	14,56 (4,18)	14 (3,88)	0,065 (0,031)	0,144 (0,68)	0,790

A — концентрации ТХДД в сыворотке крови и подкожной жировой клетчатке в день отравления. Индексы относятся к фазе двухфазной реакции; m — предполагаемое количество ТХДД, элиминированного за месяц с фекалиями, мочой, потом и с материалом, извлеченным из кожи (МИК); K — средняя константа распада для сыворотки, жировой ткани и фекалий; R^2 — коэффициент смешанной корреляции. * Недостаточно временных точек, соответствующих размеру кривой, следовательно, m_1 была рассчитана на основании первых доступных данных и предполагаемого количества мочи и пота, образующихся в течение месяца.

момент отравления t_0 и суммы выделенного за 1 мес, и K — постоянная времени распада (или скорость).

Частые хирургические вмешательства, в процессе которых было взято множество образцов биопсии кожи и удалены поврежденные ее участки, также способствовали формированию представлений о путях элиминации ТХДД. Формулу 3 использовали для расчета двухфазной кинетики (индексы указывают на фазы), которая была продемонстрирована с помощью указанных выше биопсий кожи и удаления повреждений:

$$\Delta t = \int_{t_0}^{t_1} [(m_1 e^{-K_1 t}) + (m_2 e^{-K_2 t})] dt = \\ = \frac{m_1}{K_1} (e^{-K_1 t_1} - e^{-K_1 t_0}) + \frac{m_2}{K_2} (e^{-K_2 t_1} - e^{-K_2 t_0}). \quad (3)$$

Двухфазная кинетика может быть объяснена фазой накопления в крови и жировой ткани на первой стадии, которая длилась несколько месяцев, с дальнейшим экспоненциальным распадом. Около 200 образцов материалов в течение 12 мес было извлечено из кожи, изъятой для проведения ежемесячных анализов. Эти материалы содержали собственно кожу (эпидермис и дерму), кровь, жировую ткань и кожные кисты (см. веб-приложение).

Роль источника финансирования

Спонсор исследования не принимал никакого участия в разработке дизайна исследования, сборе, анализе и интерпретации данных либо в составлении отчета. Автор, адрес для корреспонденции которого указан, имел полный доступ ко всем данным в исследовании и обладал компетенцией для принятия окончательного решения о предоставлении к публикации.

Результаты

Мы измерили концентрацию ТХДД в липидах сыворотки и образцах подкожной жировой клетчатки, взятых у Виктора Ющенко спустя 3 года. Кривые распада ТХДД в липидах сыворотки крови и образцах подкожной жировой клетчатки, рассчитанные с использованием кинетики первого порядка (рис. 3.), были схожи, подтверждая тот факт, что ТХДД находился в равновесии между липидами сыворотки и подкожной жировой клетчатки.

Концентрация ТХДД в липидах в начале и в конце периода анализов составляла 66 тыс. и 38 тыс. пг/г соответственно. Нагрузка ТХДД в начале и в конце периода анализов составляла 990 и 740 мкг соответственно. Количество ТХДД, элиминированного из организма в течение этого периода, составила 250 мкг.

Аппроксимированные (то есть по отношению к аналитическим кривым) значения расчета ТХДД, элиминированного в течение месяца (m_1), и константа распада (K_1) приведены в табл. 2. Количество ТХДД, элиминированного с фекалиями, мочой и потом, а также в процессе хирургических вмешательств, осуществленных в течение 1 года, рассчитанное с использованием формул 2 и 3, составило около 150 мкг, то есть 60% от общего (250 мкг) элиминированного организмом в течение этого времени (см. табл. 1.). Значительное количество элиминированного ТХДД, таким образом, следует объяснять его метаболизмом.

Два метаболита — 2,3,7-трихлор-8-гидроксицибензо-п-диоксин (ОН-ТриХДД) и 1, 3, 7, 8-тетрахлор-2-гидроксицибензо-п-диоксин (ОН-ТХДД) — были обнаружены в фекалиях, сыворот-

Со всеми дополнительными веб-материалами можно ознакомиться в приложениях к онлайновой версии данной статьи на сайте <http://www.thelancet.com>

Таблица 3. Концентрации метаболитов 2,3,7,8-ТХДД в образцах во времени (месяцы) после отравления ТХДД

	Образец	ОН-ТриХДД (пг/г полной массы)	ОН-ТХДД (пг/г полной массы)
11,00	Фекалии	810,0	390,0
23,00	Фекалии	610,0	160,0
28,50	Фекалии	110,0	47,0
39,25	Фекалии	33,0	16,0
9,75	Подкожная жировая клетчатка	≤15,0	≤10,0
17,50	Подкожная жировая клетчатка	≤9,3	≤9,3
15,52	Кожа	≤5,9	≤14,0
34,12	Кожа	≤3,2	≤8,0
39,25	Кожа	≤36,0	≤91,0
4,00	Сыворотка крови	12,0	8,8
6,50	Сыворотка крови	5,6	5,8
15,50	Сыворотка крови	≤2,1	≤2,1
23,00	Сыворотка крови	≤1,7	≤2,1
23,75	Сыворотка крови	≤2,9	≤3,3
28,50	Сыворотка крови	≤0,81	≤1,2
4,00	Моча	5,4	6,8
23,00	Моча	1,4	4,4
28,50	Моча	1,5	1,8

ОН-ТриХДД — 2,3,7-трихлор-8-гидроксидibenзо-п-диоксин.
ОН-ТХДД — 1,3,7,8-тетрахлор-2-гидроксидibenзо-п-диоксин.

ке и моче, тогда как ни один из них не был обнаружен в жировой ткани и коже (табл. 3; рис. 4.). Константы распада ТХДД, определенные из концентраций ОН-ТриХДД и ОН-ТХДД в фекалиях и моче в различные периоды времени, составили 0,0736 в месяц для фекалий и 0,0684 — для мочи. Сумма этих двух метаболитов, элиминированных с фекалиями и мочой, составила 90 и 5 мкг соответственно, что дает в общей сложности 95 мкг, когда мы использовали формулу 2 с т, равным 11,3 мкг в месяц для фекалий и 560 нг в месяц для мочи и соответствующей константой распада. Средняя молекулярная масса этих двух метаболитов (321 г/моль) была почти такой же, как и у ТХДД (322 г/моль), как и средние концентрации метаболитов в фекалиях и моче, что означает, что общая сумма этих двух метаболитов была эквивалентна 95 мкг ТХДД или 38% из 250 мкг, элиминированных из организма.

Обсуждение

Из 17 ПХДД и ПХДФ, проанализированных в образцах крови Виктора Ющенко, только уровни ТХДД были выше таковых в общей популяции, что свидетельствует об острой интоксикации чистым ТХДД. Виктор Ющенко является одним из двух человек, о которых сообщалось, что они подверглись воздействию высоких уровней ТХДД. Вторым таким человеком была молодая женщина с острым центрофациальным воспалительным дерматозом, начавшимся осенью 1997 г. после того, как у нее развились неспецифические симптомы со стороны желудочно-кишечного тракта слабой степени выраженности, и которая поступила в University of Vienna Medical School, Австрия, в марте 1998 г. У пациентки выявили концентрацию ТХДД в сыворотке крови 144 тыс. пг/г липидной массы [21]. Эта пациентка подверглась воздействию чистого ТХДД, содержащегося в ее пище, с развитием острого желудочно-кишечного синдрома в течение известного периода, тогда как жертвы гербицида «Agent Orange» во время вьетнамской войны [22], техногенных аварий, таких как на заводе в Icmesa в городе Севезо, Италия [23, 24], или экологического бедствия, как, например, в деревне Юшо, Япония [25], подвергались воздействию смеси химических веществ. Биологический период полувыведения ТХДД, по-видимому, зависит главным образом от его концентрации в тканях. Даже если 30 из 38% ТХДД, элиминированного из организма, возможно, связано с множественными оперативными вмешательствами, согласно расчетам оказалось, что период полувыведения был намного короче, чем обычно прогнозируют — 36–120 мес для лиц, подвергшихся умеренному воздействию. Более короткий период полувыведения у других лиц, подвергшихся воздействию более высоких уровней ТХДД во Вьетнаме, Австралии [26] и Италии [23, 24], также подтверждает обратную связь между периодом полувыведения и концентрацией в тканях. Анализ результатов проведенного лечения, специфически направленного на повышение экскреции ТХДД с фекалиями, путем манипуляции с выделением липидов (с использованием средств олеостраб⁶ и орлистат⁷) в целях сокращения периода полувыведения, является сложной задачей, и необходимы исследования, специально разработанные для оценки этих эффектов.

⁶Олеостраб — синтетический заменитель жира; обладает нулевой калорийностью и проходит через пищеварительный тракт без поглощения. Разработана фирмой Procter & Gamble Co. в 1968 г. В 1996 г. ее применение в качестве пищевой добавки было разрешено Министерством здравоохранения США (Прим. ред.).

⁷Орлистат — лекарственное средство, специфический ингибитор желудочно-кишечных липаз (Прим. ред.).

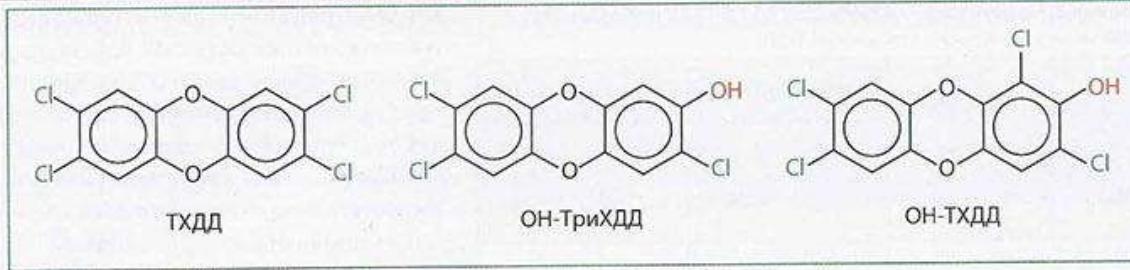


Рис. 4. Структура ТХДД и его метаболитов ОН-ТриХДД и ОН-ТХДД

Зарегистрированные концентрации ТХДД в липидах сыворотки и подкожной жировой клетчатки у данного пациента были подобны в течение 3 лет распада. Наша серия из девяти анализов ТХДД и его метаболитов в девяти образцах жировой ткани и параллельно уровней в крови для одного и того же лица, осуществленных в разные периоды времени, подтверждает результаты предыдущих исследований — то есть наличие равновесия у человека между указанными двумя компартментами [27]. Наши результаты, в дополнение к результатам предыдущих исследований, должны иметь важное значение для разработки стратегий мониторирования лиц, подвергшихся воздействию токсинами, с использованием нового метаболомического подхода.

Измерение концентрации ТХДД в крови, жировой ткани, фекалиях, моче и коже с течением времени свидетельствует о том, что в образцах, извлеченных из повреждений кожи, индуцированных ТХДД, содержится большое его количество (см. табл. 2). Эти выводы свидетельствуют о том, что индуцированное токсином поражение кожи, возможно, представляет компартмент, о котором ранее не сообщалось. Тем не менее мы установили, что основной путь элиминации ТХДД у нашего пациента был фекальным, как об этом сообщалось ранее в отношении грызунов [28–30].

Чтобы понять несоответствие между количеством ТХДД, элиминированным с фекалиями, во времени и его более быстрым, чем прогнозировалось, периодом полувыведения, мы использовали технический подход к поиску метаболитов ТХДД в образцах, взятых у нашего пациента. Мы определили два из пяти возможных гидроксилированных метаболитов, которые были предсказаны Van den Berg и коллегами [5]. Данные метаболиты составляют менее 40% от общего ТХДД, элиминируемого организмом человека, подвергшегося воздействию высоких уровней ТХДД. Наивысшие уровни метаболитов были обнаружены в фекалиях и только следы — в сыворотке крови. Отношение метаболитов к ТХДД в сыворотке крови было в 50 раз меньше, чем в фекалиях. Эти выводы свидетельствуют о том, что указанные метаболиты вряд ли были поглощены вместе с ТХДД и что ТХДД медленно метаболизируется, вероятно, печенью и кожей. В коже гены, кодирующие гидроксилазы

CYP1A1 и CYP1A2, были высоко индуцированы при определении с помощью методов количественной ПЦР, тогда как ферментативная активность CYP1A1 была существенно индуцирована в сыворотке крови при определении методом «коктейля Cooperstown 5+1»⁸ [31] (данные не приведены). Для активации ферментов I фазы необходимы высокие уровни ТХДД [8, 15, 32], что, таким образом, могло бы объяснить почему период полувыведения ТХДД зависит от степени его воздействия. Возможное появление метаболитов ТХДД ранее показано на крысах [33], собака [19], а у человека [34] — с помощью ТХДД, меченного радиоактивными изотопами, хотя их химическая структура не была выяснена. Гидроксилированные метаболиты и бромированный аналог ТХДД — 2,3,7,8-тетрабромдибензо-п-диоксин — были выявлены в желчи у крыс [35].

Несмотря на то, что ранее это не осуществлялось уровни ТХДД и его метаболитов в тканях, фекалиях и жидкостях организма должны мониторироваться пациента с тяжелой формой отравления диоксином поскольку они являются индикаторами последующего периода наблюдения и способствуют выбор стратегии лечения. Случай отравления Виктор Ющенко ТХДД претерпел изменения от сюжет изложенного в новостях, до создания медицинской модели. Эта модель отравления ТХДД указывает на то, что должны быть разработаны методы рутинового анализа метаболитов ТХДД, и основная цель исследований отравлений ТХДД в эру метаболомики должна заключаться в анализе факторов, участвующих в метаболизме данного токсина [36].

Авторы

O.S способствовал разработке дизайна исследования, поиску литературы, анализу и интерпретации данных, составлению отчета и созданию иллюстраций. J.H.S способствовал разработке дизайна исследования, поиску литературы, лечению пациента, анализу и интерпретации данных и составлению отчета. M.Z и P.S способствовали поиску литературы, анализу и интерпретации данных и составлению отчета. O.G, R.F, R.V и V.K участвовали в сборе проб и лечении пациента. Все авторы ознакомлены с окончательной версией данной публикации.

⁸«Коктейль Cooperstown 5+1» — пять препаратов, используемых для определения активности ферментной системы CYP450. Включает 150 мг кофеина, 10 мг варфарина, 40 мг омепразола, 30 мг дексстрометорфана, назначаемых преорально и 0,025 мг/кг мидазолама — в/в (а также 10 мг витамина К для противодействия фармакодинамическим эффектам варфарина) для определения активности CYP1A2, CYP2C9, CYP2C11, CYP2D6 соответственно. Активность указанных ферментов определяется по уровню метаболитов препаратов в организме (Прим. ред.).

Конфликт интересов

Мы заявляем, что у нас нет конфликта интересов.

Благодарности

Это исследование получило поддержку University of Geneva, Dermatology Foundation, и Swiss Centre for Applied Human Toxicology, Женева, Швейцария; авторы были свободны в использовании средств для их исследования случая отравления диоксином. Мы благодарим пациента за его способность справиться с этой болезнью и его готовность поспособствовать приумножению научных знаний о токсичности ТХДД; Norbert Heeb, Andreas C. Gerecke и Hans-Rudolf Buser — за полезные обсуждения; Heldur Hakk и Janice K. Huwe из US Department of Agriculture, г. Фарго, штат Северная Дакота, США — за предоставление эталонных соединений гидроксилированного ТХДД и Richard W. James — за тщательную вычитку публикации и полезные комментарии.

Источники

- Holt E. Doctor sues clinic over Yushchenko poisoning claims. *Lancet* 2005; 365: 1375.
- Rosenthal E. Liberal leader from Ukraine was poisoned. *New York Times*, Dec 12, 2004. http://www.nytimes.com/2004/12/12/international/europe/12ukraine.html?_r=1&scp=1&sq=Liberal leader from Ukraine was poisoned Dec 12 2004&st=cs (accessed July 23, 2009).
- BBC News. Tests confirm Yushchenko poison. June 2, 2006. <http://news.bbc.co.uk/2/hi/europe/5040378.stm> (accessed July 7, 2009).
- Poland A, Knutson JC. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1982; 22: 517–54.
- Van den Berg M, De Jongh J, Poiger H, Olson JR. The toxicokinetics and metabolism of polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs) and dibenzofurans (PCDFs) and their relevance for toxicity. *Crit Rev Toxicol* 1994; 24: 1–74.
- Denison MS, Nagy SR. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2003; 43: 309–34.
- Mimura J, Fujii-Kuriyama Y. Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1619: 263–68.
- Rifkind AB. CYP1A in TCDD toxicity and in physiology—with particular reference to CYP dependent arachidonic acid metabolism and other endogenous substrates. *Drug Metab Rev* 2006; 38: 291–335.
- Kohle C, Bock KW. Coordinate regulation of phase I and II xenobiotic metabolisms by the Ah receptor and Nrf2. *Biochem Pharmacol* 2007; 73: 1853–62.
- Sulistyaningdyah WT, Ogawa J, Li QS, et al. Metabolism of polychlorinated dibenzo-p-dioxins by cytochrome P450 BM-3 and its mutant. *Biotechnol Lett* 2004; 26: 1857–60.
- McKinley MK, Kedderis LB, Birnbaum LS. The effect of pretreatment on the biliary excretion of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran, and 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl in the rat. *Fundam Appl Toxicol* 1993; 21: 425–32.
- Olson JR, McGarrigle BP, Gigliotti PJ, Kumar S, McReynolds JH. Hepatic uptake and metabolism of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran. *Fundam Appl Toxicol* 1994; 22: 631–40.
- Kedderis LB, Andersen ME, Birnbaum LS. Effect of dose, time, and pretreatment on the biliary excretion and tissue distribution of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in the rat. *Fundam Appl Toxicol* 1993; 21: 405–11.
- Landi MT, Bertazzi PA, Baccarelli A, et al. TCDD-mediated alterations in the AhR-dependent pathway in Seveso, Italy, 20 years after the accident. *Carcinogenesis* 2003; 24: 673–80.
- Okino ST, Quattrochi LC, Pookot D, Iwahashi M, Dahiya R. A dioxin-responsive enhancer 3' of the human CYP1A2 gene. *Mol Pharmacol* 2007; 72: 1457–65.
- Aylward LL, Brunet RC, Carrier G, et al. Concentration-dependent TCDD elimination kinetics in humans: toxicokinetic modeling for moderately to highly exposed adults from Seveso, Italy, and Vienna, Austria, and impact on dose estimates for the NIOSH cohort. *J Expo Anal Environ Epidemiol* 2005; 15: 51–65.
- Wittsiepe J, Furst P, Schrey P, et al. PCDD/F and dioxin-like PCB in human blood and milk from German mothers. *Chemosphere* 2007; 67: S286–94.
- Brouwer A, Botschuijver S, Veerhoek D, et al. Observation of an extremely high dioxin level in a human serum sample from Ukraine by DR CALUX which was confirmed to be 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin by GC-HRMS. *Organohalogen Compounds* 2005; 67: 1705–08.
- Poiger H, Buser HR, Weber H, Zweifel U, Schlatter C. Structure elucidation of mammalian TCDD-metabolites. *Experientia* 1982; 38: 484–86.
- Gallagher D, Heymsfield SB, Heo M, Jebb SA, Murgatroyd PR, Sakamoto Y. Healthy percentage body fat ranges: an approach for developing guidelines based on body mass index. *Am J Clin Nutr* 2000; 72: 694–701.
- Geusau A, Tschachler E, Meixner M, et al. Olestra increases faecal excretion of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Lancet* 1999; 354: 1266–67.
- Steele EJ, Bellet AJ, McCullagh PJ, Selinger B. Reappraisal of the findings on Agent Orange by the Australian Royal Commission. *Toxicol Lett* 1990; 51: 261–68.
- Michalek JE, Pirkle JL, Needham LL, et al. Pharmacokinetics of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in Seveso adults and veterans of operation Ranch Hand. *J Expo Anal Environ Epidemiol* 2002; 12: 44–53.
- Kerger BD, Leung HW, Scott P Jr, et al. Age- and concentration-dependent elimination half-life of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in Seveso children. *Environ Health Perspect* 2006; 114: 1596–602.
- Yoshimura T. Yusho in Japan. *Ind Health* 2003; 41: 139–48.
- Geusau A, Schmaldest S, Derfler K, Papke O, Abraham K. Severe 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) intoxication: kinetics and trials to enhance elimination in two patients. *Arch Toxicol* 2002; 76: 316–25.
- Patterson DG Jr, Needham LL, Pirkle JL, et al. Correlation between serum and adipose tissue levels of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in 50 persons from Missouri. *Arch Environ Contam Toxicol* 1988; 17: 139–43.
- Pohjanvirta R, Vartiainen T, Uusi-Rauva A, Monkkonen J, Tuomisto J. Tissue distribution, metabolism, and excretion of 14C-TCDD in a TCDD-susceptible and a TCDD-resistant rat strain. *Pharmacol Toxicol* 1990; 66: 93–100.
- Jackson JA, Birnbaum LS, Dilberto JJ. Effects of age, sex, and pharmacologic agents on the biliary elimination of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in F344 rats. *Drug Metab Dispos* 1998; 26: 714–19.
- Abraham K, Wiesmuller T, Brunner H, Krowke R, Hagenmaier H, Neubert D. Elimination of various polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans (PCDDs and PCDFs) in rat faeces. *Arch Toxicol* 1989; 63: 75–78.
- Chainuvati S, Nafziger AN, Leeder JS, et al. Combined phenotypic assessment of cytochrome p450 1A2, 2C9, 2C19, 2D6, and 3A, N-acetyltransferase-2, and xanthine oxidase activities with the "Cooperstown 5+1 cocktail". *Clin Pharmacol Ther* 2003; 74: 437–47.
- Walker NJ, Crofts FG, Li Y, et al. Induction and localization of cytochrome P450 1B1 (CYP1B1) protein in the livers of TCDD-treated rats: detection using polyclonal antibodies raised to histidine-tagged fusion proteins produced and purified from bacteria. *Carcinogenesis* 1998; 19: 395–402.
- Poiger H, Schlatter C. Biological degradation of TCDD in rats. *Nature* 1979; 281: 706–07.
- Wendling JM, Orth RG, Poiger H. Determination of [3H]-2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in human feces to ascertain its relative metabolism in man. *Anal Chem* 1990; 62: 796–800.
- De Jongh J, Buser HR, Poiger H. The metabolism of 2, 3, 7, 8-tetrabromodibenzodioxin in the rat. *Xenobiotica* 1993; 23: 19–26.
- Nicholson JK, Lindon JC. Systems biology: metabolomics. *Nature* 2008; 455: 1054–56.