

МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ СДВИГИ ПРИ ПОВЫШЕНИИ СОДЕРЖАНИЯ ТОКСИЧЕСКИХ ЭЛЕМЕНТОВ В ОРГАНИЗМЕ

**М.Ю. Карганов, И.Б. Алчинова, О.О. Фролова, О.А. Ежова,
А.В. Шакула, В.В. Рисник, Н.И. Калетина, Н.А. Павловская**

Современный уровень развития лабораторной диагностики позволяет не только получить конкретные результаты для каждого индивидуума, но и совместно использовать принципиально различные методы для более точного определения функционального состояния отдельных систем организма. Такой подход к диагностике предполагает не механическое накопление показателей, а исследование их взаимных влияний, сочетаний, связи с клиническими симптомами и корреляции с другими показателями. В настоящей работе представлены данные, полученные при совместном использовании стандартного протокола определения содержания микроэлементов в организме и лазерной корреляционной спектроскопии (ЛКС).

Метод ЛКС успешно зарекомендовал себя в клинике как один из способов исследования нативных биологических жидкостей для оценки тяжести заболевания и эффективности лечения при бронхиальной астме [2], сахарном диабете [4], миастении [3], гематологических [1] и ряде других заболеваний [5]. Метод основан на изменении спектральных характеристик монохроматического когерентного излучения гелий-неонового лазера в результате светорассеяния при прохождении через дисперсную систему (плазма, сыворотка крови, моча, РГС). Взаимодействие лазера со светорассеивающими частицами, находящимися в броуновском движении, расширяет спектр рассеянного света, причем изменение его частоты происходит пропорционально скорости движения частиц, которая, в свою очередь зависит от их размера.

Целью настоящего исследования было выявление корреляций между изменениями в содержании некоторых токсичных микроэлементов в организме и метаболическими сдвигами, определяемыми в биологических жидкостях методом ЛКС.

Материалы и методы

Исследование выполнено на биоматериалах, полученных от 18 человек, предположительно подвергавшихся действию токсикантов (ртути и мышьяка). Образцы биоматериалов для анализа микроэлементов отбирали дважды, с интервалом в три дня, для ЛКС-исследования – однократно во время второго обследования.

Забор крови, мочи, и ротоглоточных смывов (РГС) осуществляли натощак в утренние часы. Цельную периферическую кровь объемом 100 мкл наслаивали на 400 мкл физиологического раствора, инкубировали 30 мин при комнатной температуре и центрифугировали при 3000 об/мин 15 мин. Для дальнейшего исследования отбирали надосадочную жидкость.

Для получения РГС обследуемому предлагали

прополоскать полость рта и глотки стерильным физиологическим раствором комнатной температуры на протяжении 30 сек. Полученный смыв собирали в одноразовый стакан и отбирали 1,0–1,5 мл смыва в пластиковую пробирку.

Ротоглоточный смыв представляет собой многокомпонентную водную среду, которая содержит слюну и клеточные элементы (эпителиоциты, лейкоциты), часть из которых частично или полностью разрушена. Слюна обладает высокой протеолитической активностью, поэтому большинство ее структурных ингредиентов (глико-, липопротеиновые комплексы, иммуноглобулины и др. молекулы) находятся в деградированном состоянии. Быстрое и значительное разведение физиологическим раствором этой высокоактивной в ферментном отношении жидкости приводит к резкому снижению протеолитической активности. Одновременно структурные компоненты слюны разводятся до той степени, когда обычными биохимическими и физико-химическими методами их выявление значительно затруднено.

Для ЛКС – исследования аликвоты мочи в объеме 1 мл отбирали в пластиковые пробирки и замораживали.

Образцы крови, мочи и РГС хранили до момента ЛК-измерений в замороженном виде при -200°C . Перед непосредственным применением образец размораживали при комнатной температуре и центрифугировали в течение 15 мин при 5000 об/мин. Для проведения непосредственного измерения с получением индивидуальных спектров 0,4–0,5 мл надосадочной жидкости биологического образца помещали в кювету спектрометра.

Лазерный корреляционный спектрометр ЛКС-03 («ИНТОКС», Санкт-Петербург) позволяет определять светорассеивающие частицы с размерами от 1 до 10000 нм. В этот диапазон попадают практически все биомолекулы и комплексы. Показано, что получаемые данные являются объективной и чувствительной характеристикой состояния гомеостаза на молекулярном и надмолекулярном уровнях [5, 6]. В результате математической обработки распределение частиц представленное в виде гистограммы позволяет охарактеризовать дисперсный состав конкретной биологической жидкости и классифицировать распределения в соответствии с выделенными информативными зонами спектра [5, 6]. Для плазмы или сыворотки крови весь диапазон спектра делится на 5 дискретных зон (по размерам светорассеивающих частиц): I – 0–10 нм; II – 11–30 нм; III – 31–70 нм; IV – 71–150 нм; V – 150 и выше. Для анализа образцов мочи и РГС используется та же методика, при этом выделяются иные информативные зоны. Весь диапазон спектра для РГС делится на 4 информативные

дискретные зоны (по размерам светорассеивающих частиц): I – 0-50 нм; II – 51-400 нм; III – 400-2000 нм; IV – выше 2000 нм. Для мочи: I - менее 75 нм; II – 76-220 нм; III – 221-1500 нм; IV – выше 1500 нм. Предполагается, что нарастание площадей низко- и среднемолекулярных мод ЛК-спектров свидетельствует о преобладании процессов биосубстратной деградации, а высоко- и сверхвысокомолекулярных мод – о преобладании процессов биосубстратной полимеризации. В зависимости от увеличения (или снижения) процентного вклада в светорассеяние частиц той или иной фракции, была предложена семиотическая классификация ЛКС образцов, включающая идентификацию 8 различных направлений сдвигов в обмене веществ и гуморальном иммунитете: интоксикационно-, катаболически-, дистрофически-, аллерго- и аутоиммунно-подобные, нормологические спектры и 2 типа смешанных спектров. При этом каждому симптомокомплексу соответствует несколько градаций, отражающих степень выраженности перечисленных спектральных сдвигов: начальная, умеренная и выраженная. Для облегчения анализа все многообразие спектров можно разделить на три группы: «норма», спектры с преобладанием катаболических процессов (характеризуются увеличением вклада в светорассеяние низко- и среднемолекулярных субфракций) и спектры с преобладанием анаболических процессов (характеризуются увеличением вклада в светорассеяние высоко- и сверхвысокомолекулярных субфракций [5].

Согласно априорной информации, полученной на различных видах патологий, в эти зоны попадают молекулярные компоненты клеток от мономерных альбулярных белков до высокомолекулярных белковых комплексов.

Параллельно с ЛКС исследованием проводился отбор биоматериалов для токсикологической экспертизы.

Для определения содержания химических элементов собирали среднюю порцию утренней мочи (10 мл) в стандартные пластиковые контейнеры (пробирки) с крышкой.

Забор крови производится в пробирки-контейнеры (например, "S-Monovette", "Venoject", "Vacuett®"), специально предназначенные для получения плазмы крови.

Объем плазмы составлял не менее 1,5 мл. В качестве антикоагулянта использовали гепарин. После взятия крови пробирки мягко переворачивали не менее 5 раз для предотвращения образования микрогустков.

Волосы для определения микроэлементного состава состригали специальными ножницами из нитрида титана и собирали в специальные бумажные пакеты. Масса пробы равнялась приблизительно 50 мг.

Для определения элементов в биосубстратах использовали два метода анализа: атомно-эмиссионную спектрометрию с индуктивно-связанной плазмой (ИСП-АЭС) и масс-спектроскопию с индуктивно-связанной плазмой (ИСП-МС). Метод ИСП-АЭС, обладающий меньшей чувствительностью и высокой

точностью определения высоких концентраций, поэтому использовался для анализа матричных элементов в биологических образцах, таких как Na, Mg, Al, P, K, Ca, Fe, Zn. Метод ИСП-МС обладает высокой чувствительностью и позволяет определить быстро и с высокой точностью определять комплекс микро- и ультрамикроэлементов в образцах (Li, Be, B, V, Co, As, Se, Rb, Cd, Sn, Cs, Hg, Tl, Cr, Mn, Ni, Cu, Sr, Ba, Pb и др.). За счет применения двух независимых методов повысилась надежность результатов, увеличился набор количественно определяемых элементов и сократилось общее время, затрачиваемое на анализ.

Результаты и их обсуждение

При анализе ЛКС спектров различных биологических жидкостей было обнаружено, что в данной выборке со стороны сывороточного гомеостаза наблюдается преобладание спектров, в которых основной вклад в светорассеяние вносят мелкие частицы. Основную часть составляют интоксикационно-подобные и катаболические метаболические сдвиги, и небольшая часть принадлежит дистрофическим сдвигам, что является следствием преобладания в организме процессов гидролиза и катаболизма.

ЛК – гистограммы мочи и рото-глоточных смывов отражают процессы деструкции эпителиальной ткани. В данной выборке со стороны начальных отделов пищеварительной системы и верхних дыхательных путей наблюдались в основном нормологические и анаболические сдвиги, а со стороны выделительной системы встречались как нормологические, так и катаболически – и анаболически-направленные (Рис. 1). И, хотя мы не можем доказать сам факт отравления или его степень, были получены достоверно значимые корреляции между данными ЛКС-исследования и результатами стандартной токсикологической экспертизы.

При анализе была выявлена обратная корреляция между направлением сдвигов в РГС и концентрацией мышьяка в моче, отобранной для обследования при первом заборе: чем меньше концентрация мышьяка в пробах мочи, тем больше вклад в светорассеяние частиц крупного размера в пробах РГС ($r = -0,75$, $p < 0,05$). Кроме того, можно отметить две тенденции, связанные с концентрацией ртути: в моче ($r = 0,06$, $p < 0,05$) и в волосах ($r = 0,074$, $p < 0,05$) при втором заборе, которые также указывают на то, что в пробах с низкими концентрациями металлов вклад в светорассеяние крупных частиц выше.

Анализ преобладающих направлений метаболических сдвигов в пробах сыворотки крови показал наличие корреляционной связи с концентрацией металлов в моче. Значимые корреляции получены для проб, отобранных при втором заборе: ртуть ($r = 0,50$, $p < 0,05$) и мышьяк ($r = 0,82$, $p < 0,05$), и на уровне тенденции - для взятых ранее: ртуть ($r = 0,44$, $p < 0,066$) и мышьяк ($r = 0,56$, $p < 0,09$). Чем выше концентрации металлов в моче, тем выше вклад в светорассеяние мелких частиц.

Преобладающие направления метаболических

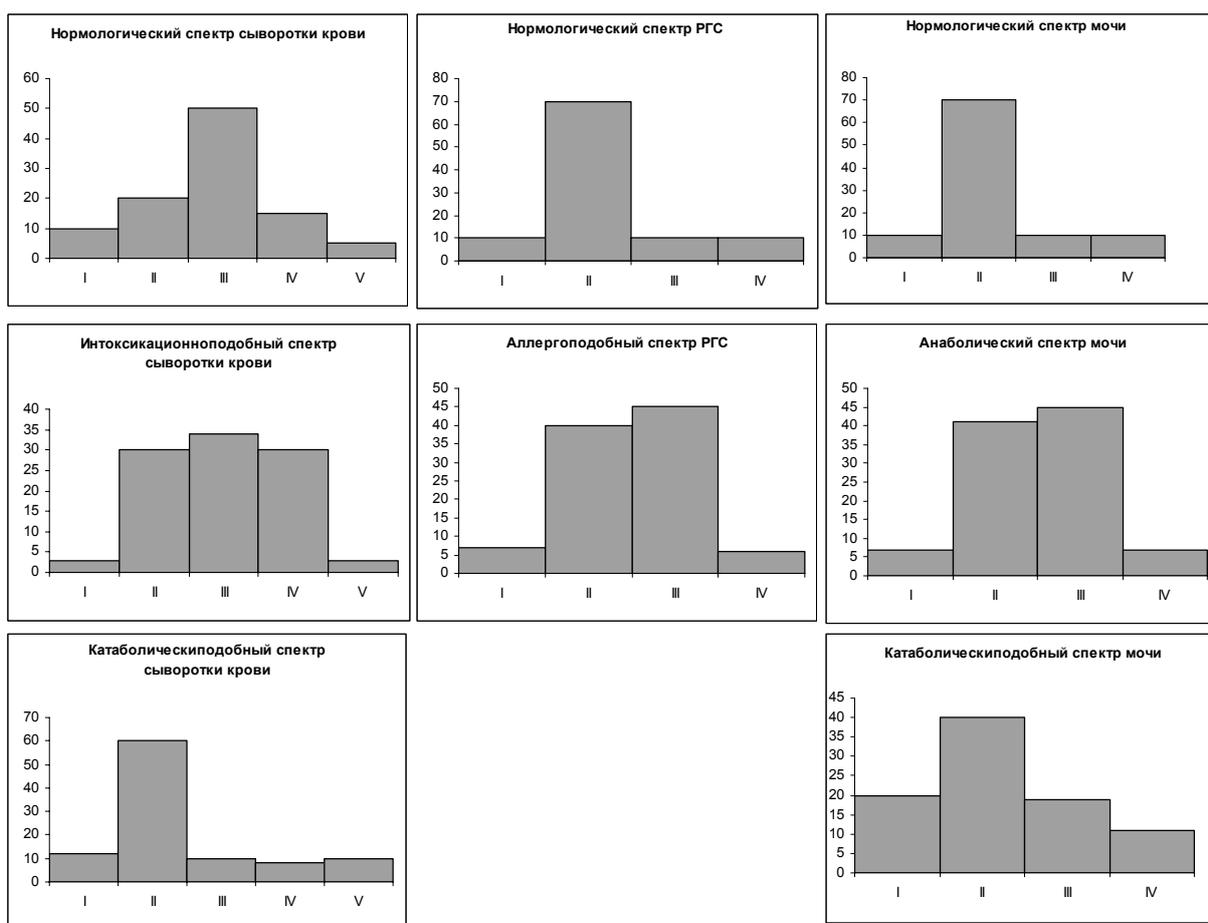


Рис. 1 ЛК– спектры различных биологических жидкостей (сыворотка крови, РГС, моча)

сдвигов в моче коррелируют с концентрацией ртути в волосах: все большее нарастание в спектрах мелких частиц коррелирует с большими концентрациями ртути, в пробах первого забора эта корреляция достоверна ($r = 0,48, p < 0,05$), в более поздних пробах – на уровне тенденции ($r = 0,52, p < 0,068$). Кроме этого, в образцах с нарастающим числом мелких частиц концентрация марганца меньше, чем в пробах с высоким вкладом частиц крупного размера ($r = -0,73, p < 0,05$).

Более подробный анализ связи концентраций металлов с вкладом в светорассеяние частиц определенной зоны показал корреляцию наличия мышьяка в моче и ростом частиц первой (0-10 нм) зоны ($r = 0,53, p < 0,05$) и тенденцию к уменьшению вклада в светорассеяние частиц третьей (31-70 нм) зоны ($r = -0,43, p < 0,07$) в ЛК – гистограммах сыворотки крови.

Увеличение концентрации мышьяка в моче коррелирует с увеличением второй (51-400 нм) ($r = 0,76, p < 0,05$) и уменьшением вклада в светорассеяние третьей (401-2000 нм) ($r = -0,79, p < 0,05$) зон в пробах РГС, а увеличение концентраций этого металла в волосах – с увеличением вклада частиц первой (0-50 нм) зоны ($r = 0,58, p < 0,05$).

Высокие концентрации мышьяка ($r = 0,48, p < 0,05$) и марганца ($r = 0,51, p < 0,05$) коррелируют с увеличением вклада в светорассеяние частиц третьей (401-2000 нм) зоны в ЛК пробах мочи. Вы-

сокие концентрации ртути в волосах коррелируют с уменьшением вклада частиц четвертой (свыше 2000 нм) зоны ЛКС мочи.

Таким образом, в пробах биологических жидкостей от лиц с превышением содержания металлов, исследованных методом ЛКС, наблюдается значительное увеличение вклада в светорассеяние преимущественно мелких частиц.

Все выявленные изменения в содержании токсичных элементов не выходят за пределы биологически приемлемых и не должны приводить к развитию заболеваний. Известно, что само по себе повышенное содержание токсичных элементов не свидетельствует о развитии патологии. Кроме того, индивидуальные особенности саногенетических систем организма обуславливают различные последствия для здоровья при одинаковом воздействии малых доз потенциально вредных факторов [7]. Тем не менее, их корреляция со вкладами в светорассеяние частиц определенного размера биологических жидкостей позволяет предположить, что изменения в микроэлементном составе связаны с метаболическими сдвигами.

Как известно, ртуть в низких концентрациях усиливает процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ), вначале повышая, а затем снижая активность антиокислительных ферментов. В этом случае можно ожидать накопления продуктов ПОЛ (малонового диальдегида, бета-микроглобулина, белка в моче [7].

Действительно, выявлены положительные корреляции содержания токсических элементов и относительного количества мелких частиц в исследованных биологических жидкостях. Кроме того, обнаружена тенденция к снижению вклада в светорассеяние фракции, в которой содержатся иммуноглобулины, в сыворотке крови по мере возрастания концентрации мышьяка в моче. Ранее было показано, что интенсивность светорассеяния этой фракции коррелирует с содержанием иммуноглобулинов, определенных лабораторными методами [1].

Наибольшее число корреляций выявлено со сдвигами в моче и рото-глоточных смывах. Видимо, это связано с начальными стадиями повреждения функциональной активности почек и предположительно пероральным путем поступления токсикантов в организм [7].

Наблюдаемые изменения в направленности метаболических сдвигов носят стохастический характер, отражая адаптивные либо дезадаптивные реакции организма на малые дозы токсических веществ. Выяснение истинного смысла обнаруженных закономерностей требует расширения выборки и интервала действующих концентраций.

Литература

1. Ковалева О.И., Ковалева Л.Г., Горбунова Н.А., Карганов М.Ю. Новые возможности ранней диагностики заболеваний системы крови // Гематология и трансфузиология, 2004, Т.49, №4, с.7-13
2. Пирузян Л.А., Ковалев И.Е., Ковалева В.Л., Тюменцева Е.С., Карганов М.Ю., Балаболкин И.И., Ковалева О.И., Румянцева Е.И. Лазерная корреляционная спектроскопия макромолекулярных комплексов в сыворотке крови как эффективный метод оценки течения заболевания бронхиальной астмой у детей // Докл. Академии наук, 2004, т.395, № 6, с. 832-836.
3. Карганов М.Ю., Ковалева О.И., Санадзе А.Г., Сиднев Д.В., Пивоваров В.В., Ланда С.Б. Сравнительный анализ информативности радиоиммунологического исследования и лазерной корреляционной спектроскопии при миастении и миастенических синдромах // Неврологический журнал, 2003, Т.8, пр. №1, с.26-29
4. Румянцева Е.И., Ковалев И.Е., Ковалева О.И., Карганов М.Ю. Лазерная корреляционная спектроскопия макромолекулярных комплексов как эффективный метод выявления передозировки инсулина и коррекции инсулинотерапии при сахарном диабете у детей // Докл. Академии наук, 2005, Т.402, №3, с.1-4.
5. Бажора Ю.И., Носкин Л.А. Лазерная корреляционная спектроскопия в медицине / Одесса: Друк, 2002, 400 С.
6. Лебедев А.Д., Левчук Ю.Н., Ломакин А.В., Носкин В.А. Лазерная корреляционная спектроскопия в биологии / К.: Наукова думка, 1987. – 266 с.
7. Капцов В.А., Павловская Н.А., Величковский Б.Т. Лабораторная диагностика. Руководство по методам исследования профессиональных, экологически зависимых заболеваний и действия наркотических веществ / М. – Реинфор. – 2005. – 265 С.