

ОЦЕНКА СОДЕРЖАНИЯ ЭССЕНЦИАЛЬНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ В КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ГОЛОВНОГО МОЗГА МЕТОДАМИ АТОМНО-ЭМИССИОННОЙ СПЕКТРОМЕТРИИ

Зажогин А.П.¹, Булойчик Ж.И.¹, Нечипуренко Н.И.², Патапович М.П.³,
Пашковская И.Д.²

¹Белорусский государственный университет
пр. Независимости, д. 4, г. Минск, 220030, Беларусь; e-mail: zajogin_an@mail.ru

²Республиканский научно-практический центр неврологии и нейрохирургии
ул. Ф. Скорины, д. 24, г. Минск, 220114, Беларусь

³Белорусская государственная академия связи
ул. Ф. Скорины, д. 8/2, г. Минск, 220114, Беларусь

Поступила в редакцию: 29.06.2018

Аннотация. Методом атомно-эмиссионной многоканальной спектроскопии проведен анализ образцов плазмы крови пациентов с аневризмами мозга. Дана интегральная оценка метаболизма жизненно необходимых элементов (ЖНЭ). Обнаружено значительное повышенное содержание алюминия, железа, кальция, цинка и пониженное по магнию у всех пациентов как до операции, так и после. Выявленные микроэлементозы могут влиять на особенности клинического течения заболевания и обосновывают целесообразность дополнения терапии медикаментозными комплексами для коррекции минерального обмена. Исследована морфология высохшей капли плазмы крови. Выявлены структурные особенности высохших капель. Получены количественные результаты пространственного распределения кальция по поверхности высохших капель этих биологических жидкостей, а также в слоях с использованием метода лазерной атомно-эмиссионной спектроскопии. Показано, что метод лазерной атомно-эмиссионной спектроскопии дает возможность количественно оценить изменения в белковых центрах и является оперативным высокочувствительным инструментом в диагностике заболеваний. Полученные экспериментальные данные могут быть основой для дальнейшей разработки методологии ранней диагностики нарушения уровня функциональных резервов организма и выработки системы реабилитационных мероприятий.

Ключевые слова: атомно-эмиссионный спектральный анализ, плазма крови, биологическая жидкость, морфология капли, лазерная атомно-эмиссионная спектроскопия, пространственное распределение кальция, послыйный анализ.

Цереброваскулярные заболевания, включающие различные формы острых и хронических расстройств мозгового кровообращения, нередко приводящие к серьезным негативным последствиям, продолжают требовать поиска новых подходов к их профилактике и лечению.

Одной из наиболее тяжелых форм цереброваскулярных заболеваний является инсульт. Наиболее распространенным типом инсульта (до 87 % случаев) является инфаркт мозга. В связи с этим большое количество современных научных работ посвящено изучению патогенеза церебральной ишемии и инфаркта мозга. Ишемия головного мозга является одним из результатов снижения мозгового кровотока и ограничения поступления кислорода к его тканям. Аневризмы сосудов головного мозга (АСГМ) можно рассматривать как медленно текущее ишемическое повреждение мозга, что непременно требует нейрохирургического вмешательства. Церебральная ишемия является основополагающим процессом патогенеза инфаркта мозга.

По этиологии принято дифференцировать кровоизлияния в мозг на первичные (спонтанные), когда точная причина не установлена, и вторичные (симптоматические), при которых установлен конкретный источник, причина кровоизлияния (разрыв аневризмы, артериовенозная мальформация, опухоль). Ведущим фактором возникновения первичных кровоизлияний является повреждение сосудистой стенки у пациентов с артериальной гипертензией. Наиболее частой причиной вторичных внутричерепных кровоизлияний является разрыв аневризмы или артериовенозной мальформации, а также сосудистый спазм [1].

Субарахноидальное кровоизлияние (САК) – одна из ведущих причин развития инсульта молодого возраста. Наиболее частой причиной развития САК являются мешотчатые аневризмы (80-85 %). Аневризмы сосудов мозга бывают врожденными, но гораздо чаще развитие аневризм, в том числе мешотчатых, происходит в течение жизни.

В настоящее время не вызывает сомнения значительная роль микроэлементов в многообразных функциях организма и каждой клетки в отдельности, их участия в метаболизме при сосудистых поражениях, их роли в патогенезе цереброваскулярных заболеваний. В неповрежденном мозге уровень кровотока зависит от уровня метаболических потребностей ткани, в условиях мозговой катастрофы взаимосвязанный баланс уровня и ауторегуляции мозгового кровотока нарушается. Роль микроэлементов в этих процессах изучена еще недостаточно.

При поражениях головного мозга разворачивается каскад внутри- и внеклеточных механизмов, происходят изменения нейронов с последующей их гибелью, что приводит к смерти клетки – «апоптозу». Вначале

«апоптоз» считали генетически запрограммированным универсальным механизмом клеточной гибели, началом фрагментации ДНК, т.е. разрушением ядра клетки. К настоящему времени получены доказательства, что апоптоз клеток является причиной отсроченной гибели нейронов, т.е. на ранних стадиях развития апоптоза нейрона наряду с фрагментацией ДНК сохраняется и возможность репарации. Многие факторы могут выступать в качестве ингибиторов и активаторов апоптоза, в том числе и микроэлементы. В зависимости от концентрации микроэлементы способны ингибировать или активировать процесс апоптоза клеток в разных органах и тканях [2].

Целью данной работы является изучение мониторинга и динамики изменения концентрации эссенциальных элементов (ЭЭ) в образцах плазмы крови пациентов с аневризмой сосудов головного мозга для оценки характера протекания процесса и выработки своевременной стратегии лечебных и профилактических мероприятий. Для этого было определено общее содержание ряда ЭЭ в плазме крови таких больных, изучена морфология высохшей капли, проведена полуколичественное определение локального пространственного распределения кальция по поверхности и слоям высохшей капли.

Общее содержание ЭЭ в плазме крови определяли методом атомно-эмиссионной спектроскопии на приборе ЭМАС 200Д. Использовали угольные электроды диаметром 6 мм марки ОСЧ-7-3 с цилиндрическим углублением диаметром 4 мм на торце. Анализируемые растворы (20 мкл) наносили в углубление электрода и высушивали под излучением ИК-лампы в течение 30-40 мин. Подготовленные пробы сжигали в дуге переменного тока. Сила тока 6 А.

Первый этап исследований – определение общего содержания эссенциальных элементов в плазме крови. Объектами исследований являлись пациенты с АСГМ различного типа: артерио-венозная мальформация (АВМ), неразорвавшаяся (НАА) и разорвавшаяся артериальная аневризма (РАА), субарахноидальное кровоизлияние (САК).

Анализировали образцы плазмы крови пациентов (25 человек) до операции, в течение 10 дней после операции. В таблице 1 приведены типичные результаты определения общего содержания микроэлементов в образцах плазмы крови нескольких пациентов. Содержание элементов установлено для доверительной вероятности 0,95. Внизу таблицы приведены референтные значения концентрации каждого элемента.

Анализ полученных данных количественного определения общего содержания микроэлементов в плазме крови пациентов свидетельствуют о серьезных нарушениях минерального обмена. Самые заметные отклонения от нормы наблюдается в концентрации кальция и магния - микроэлементов, играющих самую значимую роль в развитии заболеваний головного мозга. Общим является то, что у всех пациентов независимо от типа кровоизлияния понижено содержание магния, значительно повышены концентрации алюминия, железа, кальция, только концентрация меди близка к норме.

Из-за нарушения баланса у клеток поврежденной области мозга недостаточно энергии для нормального функционирования, замедляется энергетический обмен в клетках с дисфункцией митохондрий и усилением процессов свободнорадикального окисления. Это подтверждается ролью каждого микроэлемента в развитии заболеваний головного мозга [3, 4].

Магний – обязательный участник синтеза всех нейропептидов в головном мозге. Крупные статистические исследования подтвердили значение предшествующей инсульту гипомagneзии [5]. Первыми при дефиците магния трансформируются сосуды сердца и мозга. Ионы магния – естественный антагонист кальция. Они модулируют его внутриклеточную активность. В гипомagneиевых участках эпителия создаются условия для избыточной кальцификации на фоне нормального и даже пониженного поступления кальция в организм. Дефицит магния не только потенцирует процессы склерозирования и усиление кальцификации атеросклеротической бляшки, но и создает условия для повторных инсультов [5, 6]. При нарушении баланса магний-кальций происходит гибель нейронов за счет повышенной проницаемости мембраны клетки для ионов кальция.

Таблица 1. Концентрация элементов в плазме крови пациентов, мкг/100 г

Пациент	Al	Mg	Ca	Fe	Cu	Zn
1 РАА САК до	117	1360	17300	266	115	180
1 РАА САК после	121	1850	25300	223	136	260
2 АВМ до	33	1490	24800	49	72	190
2 АВМ после	78	1510	18400	121	59	130
3 РАА САК до	73	1460	28800	277	38	250
3 РАА САК после	86	1420	22400	240	161	120
Референтные значения концентраций						
Нижнее	0	1600	8800	36	69	90
Верхнее	6	2500	10400	144	142	120

Сказанное выше подчеркивает существенную роль, которую играет кальций в развитии атеросклероза и ишемических изменений в головном мозге. Повышенное высвобождение кальция способствует ишемическому повреждению нейронов и инициации каскада апоптоза. Избыток кальция в клетках усиливает продукцию кислородных радикалов в митохондриях, активирует ряд клеточных ферментов и вызывает деградацию белковых и липидных структур [5, 6].

Из эссенциальных элементов обмен железа занимает особое место. Хотя железо принимает активное участие в транспорте кислорода гемоглобином, оксидоредукции многочисленных митохондриальных ферментов, однако этот биоэлемент обладает таким отрицательным свойством, как способность генерировать свободные радикалы и инициировать перекисное окисление липидов. Повышенный уровень сывороточного железа способствует повышенному риску ишемического инсульта. В его фармакотерапии могут быть перспективными хелаторы железа.

Отклонения от нормы меди и цинка несут соответствующую неврологическую симптоматику, указывают на сдвиги в антиоксидантной системе. Медь вызывает оксидативную модификацию липопротеидов низкой плотности, что приводит к апоптозу клеток. Цинк, хотя обладает способностью защищать эндотелий сосудов при атеросклерозе и сосудистой ишемии, но, вместе с тем, в определенных концентрациях сам также является стимулятором апоптоза [3].

Резюмируя полученные данные по общему содержанию ЭЭ, следует отметить, что концентрации элементов, определяемые в плазме крови пациентов до и после операции не претерпели принципиальных изменений и остались сопоставимыми. Этот фактор, по-видимому, является доминирующим для медикаментозной терапии при дальнейшей реабилитации больного.

Для изучения морфологии и пространственного распределения кальция в высохшей капле плазму крови (10 мкл) наносили на обезжиренную пластинку оргстекла, высушивали при комнатной температуре в открытой системе в течение 90 - 100 минут. Диаметр высохшей капли равен примерно 6 мм.

Снимки высохших капель плазмы крови регистрировали, используя микроскоп Биолам со светодиодной подсветкой (на пропускание) и веб-камерой, работающей с компьютером по USB-2 порту.

При протекании патологических процессов патология проявляется в появлении различных структурных конфигураций, например, трехлучевых трещин, характеризующих застойные явления, «язычков Арнольда и ковров Серпинского» при воспалительных процессах, структур «жгута» при гипоксии [7-9].

На рисунке 1 приведены снимки высохших на твердой поверхности после 90 минут сушки капель плазмы крови нескольких пациентов до и после операции.

В высохших каплях плазмы крови всех пациентов были обнаружены довольно схожие структуры (жгуты, трехлучевые трещины и пр.). После проведенных пациентам операций картины структурирования высохшей капли меняется незначительно. Структуры, характерные для здорового человека (краевой белковый валик, радиальное растрескивание), практически отсутствуют в морфологии капель пациентов как до, так и после операции.

Для установления взаимосвязи полученных морфологических картин высохших капель с динамикой протекания патологического процесса нами проведено аналитическое определение локального пространственного распределения кальция в высохших каплях по поверхности и слоям высохшей капли. Акцент сделан на определение кальция, поскольку он «спектроскопически доступен», является одним из самых необходимых элементов в организме, наиболее активным коацерватом в белковой среде, легко образует связи с amino- и карбоксильными группами белковых молекул, что определяет картину структурирования БЖ.

Локальное пространственное распределение кальция по поверхности и слоям высохшей капли оценивали, используя лазерный многоканальный атомно-эмиссионный спектрометр LSS-1. Лазерное излучение фокусируется на образец с помощью ахроматического конденсора с фокусным расстоянием 104 мм. Размер пятна фокусировки примерно 50 мкм. Все эксперименты проводили в атмосфере воздуха при нормальном атмосферном давлении. Анализировали суммарные результаты действия 5 последовательных двоек лазерных импульсов (СЛИ). Энергия лазерного излучения составляла 34 мДж (первый и второй импульсы, соответственно), временной интервал между двоек импульсами – 8 мкс. Абляция осуществлялась через 0,6 мм. Размер точки повреждения 0,10-0,15 мм. По диаметру пробы анализ проводили в 12 точках поверхности.

Результаты полуколичественного определения пространственного распределения кальция в высохших каплях плазмы крови пациентов до (д) и после (п) операции приведены на рисунке 2. Приведены интенсивности линии кальция Са II (393,366 нм) по диаметру (горизонталь) на поверхности высохшей капли, а также при послыном определении (5 слоев) в каждой анализируемой точке.

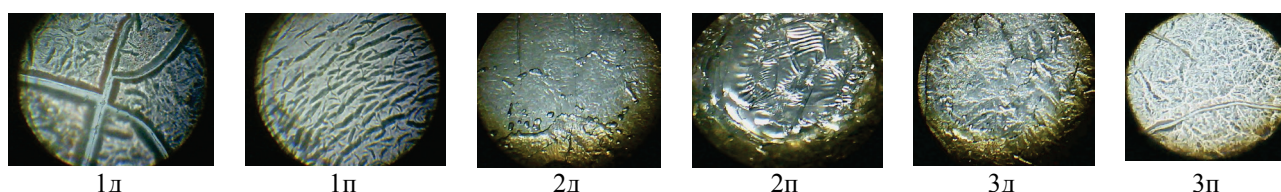


Рисунок 1. Высохшие капли плазмы крови пациентов до и после операции

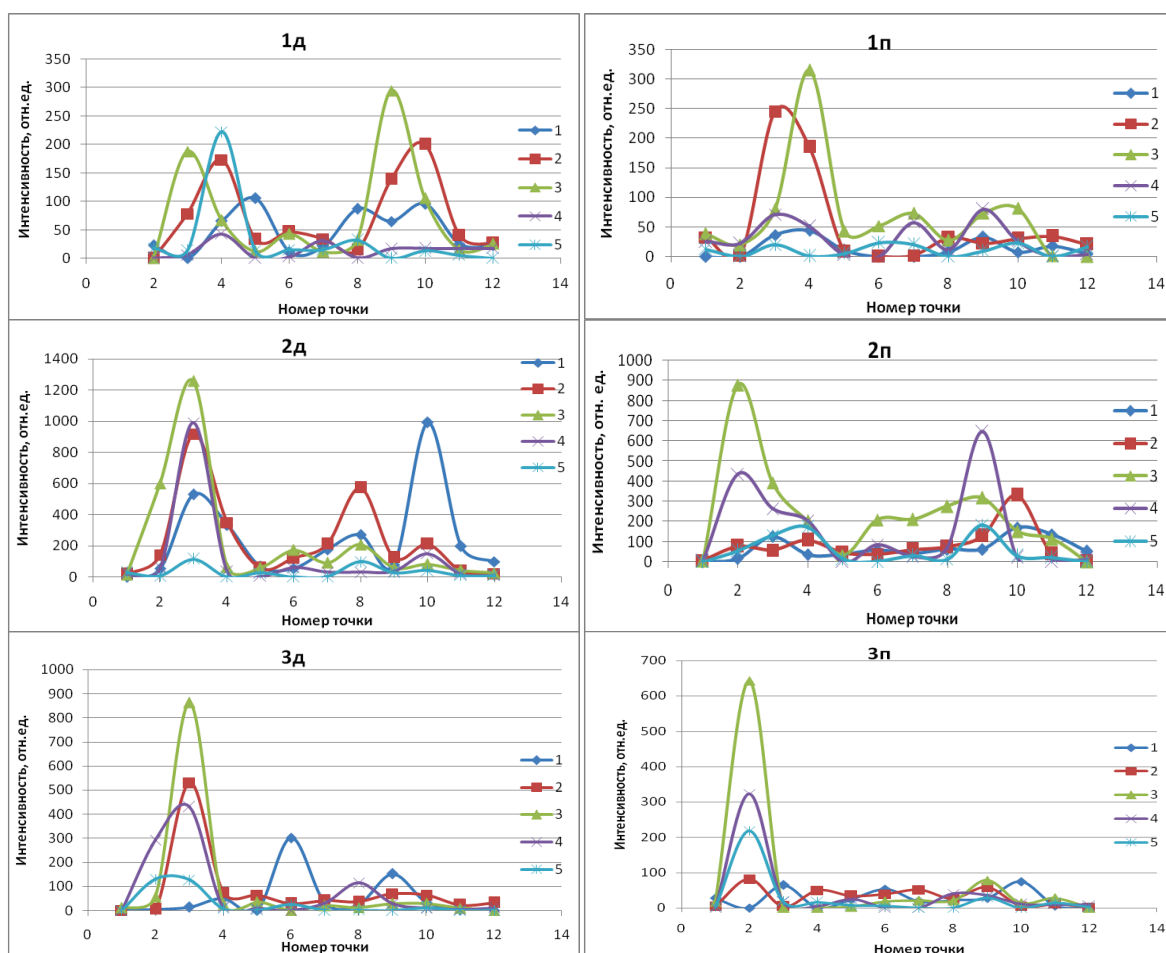


Рисунок 2. Интенсивность линии Ca II (393,366 нм) в атомно-эмиссионных спектрах высохших капель плазмы крови пациентов

Приведенные рисунки не позволяют четко и системно дифференцировать изменения, произошедшие после хирургического и терапевтического лечения. Обнаруживается достаточно хаотичный разброс концентрации кальция как по поверхности высохшей капли, так и по слоям у пациентов как до, так и после операции. Во всех случаях общим является то, что его максимальное содержание приходится в основном на три верхних слоя. В нижнем четвертом и пятом слое кальций практически не обнаружен.

Ранее нами было показано, что в случае онкологических заболеваний при наличии опухоли головного мозга кальций определяется именно в самых глубоких слоях высохшей капли [10-12], что свидетельствует о существенной аномальной коагуляции белковых молекул и является своего рода онкомаркером. При этой патологии происходит серьезная утрата системообразующих свойств БЖ, что и проявляется в резком изменении морфоструктуры. После хирургического удаления опухоли морфология высохшей капли и локальное распределение кальция существенно меняются, заметно приближаясь к значениям кальция у здорового человека [10-12].

В случае АСГМ после проведения операции хотя и прослеживается некоторая упорядоченность структуры высохшей капли, но вместе с тем не исчезла хаотичность в распределении кальция, нет системных изменений его содержания как сразу после операции, так и через длительный срок. Наблюдаемые изменения концентрации элементов, морфоструктуры высохшей капли, пространственного распределения кальция могут быть фармакологическим ответом на воздействие назначаемых в процессе лечения препаратов и определять эффективность терапевтического лечения после нейрохирургического вмешательства. Это, по-видимому, свидетельствует о медленно прогрессирующем ишемическом поражении головного мозга.

Таким образом, анализ содержания химических элементов в плазме крови у пациентов с аневризмой сосудов головного мозга позволил выявить особенности микроэлементных изменений в организме, что влечет за собой нарушения протекания многих биохимических и физиологических реакций при гипоксическом повреждении головного мозга. Установлено достаточно значимое снижение суммарного уровня магния в плазме крови. Показано достоверное превышение нормальных значений суммарного содержания алюминия, кальция и железа.

Установление характера и степени нарушения клеточного гомеостаза эссенциальных элементов, отслеживание временных изменений их концентраций позволяет характеризовать скорость протекания хронической ишемии и оценивать потенциальные возможности организма.

Используемые в настоящее время в клиниках терапевтические мероприятия направлены, в основном, на предотвращение ишемического коагуляционного некроза за счет сосудорасширяющего эффекта и не учитывают возможность гибели нейронов вследствие апоптоза. Дополнение лечения препаратами, уменьшающими риск развития апоптоза, возможно откроет новые возможности в предотвращении или уменьшении последствий заболеваний головного мозга.

Список литературы / References:

1. Румянцева С.А., Афанасьев В.В., Силина Е.В., Елисеев Е.В.. Методы рациональной фармакокоррекции и профилактики вторичной ишемии и вазоспазма у больных с нарушениями мозгового кровообращения различного характера. *Трудный пациент*, 2010, № 6, с. 19-25. [Rumyantseva S.A., Afanasiev V.V., Silina E.V., Eliseev E.V. The methods of rational pharmacocorrection and prophylaxis of the secondary ischemia and vasospasm of the patients suffering from disturbances in cerebral circulation of different character. *Difficult patients*, 2010, no. 6, pp. 19-25. (In Russ.)]
2. Угольник Т.С., Чубукова Т.Н. Механизмы апоптоза при ишемии головного мозга. *Проблемы здоровья и экологии*, 2009, № 3(21), с. 94-99. [Ugolnik T.S., Chubukova T.N. The apoptosis mechanisms on cerebral ischemia. *Problems of health and ecology*, 2009, no. 3(21), pp. 94-99. (In Russ.)]
3. Новикова Л.Б., Громова О.А., Курамшина Д.Б. Роль микроэлементов при ишемическом инсульте. *Медицинский Вестник Башкортостана*, 2010, т. 5, № 4, с. 156-160. [Novikova L.B., Gromova O.A., Kuramshina D.B.. The role of microelements in ischemic stroke. *Bashkortostan medical journal*, 2010, vol. 5, no. 4, pp. 156-160. (In Russ.)]
4. Кудрин А.В., Громова О.А. *Микроэлементы в неврологии*, М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006, 304 с. [Kudrin A.V., Gromova O.A.. *Microelements in neurology*, M.: GEOTAR-media, 2006, 304 p. (In Russ.)]
5. Suter P.M. The effects of potassium, magnesium, calcium and fiber on risk of stroke. *Nutr. Rev.*, 1999, vol. 57, no. 3, pp. 84-88.
6. Gelmers H. J. Effect of calcium antagonists on cerebral circulation. *Amer. J. Cardiol*, 1987, vol. 59, pp. 173-176.
7. Максимов С.А. Морфология твердой фазы биологических жидкостей как метод диагностики в медицине. *Бюллетень сибирской медицины*, 2007, № 4, с. 80-85. [Maksimov S.A. Morphology of the solid phase of biological fluids as a diagnostic method in medicine. *Siberian Medical Bulletin*, 2004, no. 4, pp. 80-85. (In Russ.)]
8. Краевой С.А., Колтовой Н.А. *Диагностика по капле крови. Кристаллизация биожидкостей. В 4 кн. М.*, 2013. Книга 1. Открытая капля, с. 67-71. [Kraevoy S.A., Koltovoy N.A. *Diagnosis on the basis of one blood drop. Crystallization of biological fluids. In 4 books. M.*, 2013. Book 1. Open drop. pp. 67-71. (In Russ.)]
9. Сидоренко Ю.С., Шихлярова А.И., Сергостьянц Г.З. Региональные особенности морфологии крови больных раком легкого: процессы самоорганизации в динамике хирургического лечения и аутогемотрансфузии. *Вестник южного научного центра РАН*, 2005, т. 1, № 4, с. 64-71. [Sidorenko Yu.S., Shikhlyarova A.I., Segostjantz G.Z. Regional features in blood morphology of the patients with cancer of lung: the self-organization processes in dynamics of surgery and autohemotransfusion. *J. of the Southern Research Center of RAS*, vol. 1, no. 4, 2005, pp. 64-71. (In Russ.)]
10. Булойчик Ж.И., Веремчук А.Н., Русско Т.А., Маслова Г.Т., Мавричев А.С. Морфологическое и спектрометрическое изучение образцов высохших капель крови онкологических больных. *Вестник БГУ. Серия 1*, 2015, № 2, с. 24-30. [Buloichik J.I., Veremchuk A.N., Russko T.A., Maslova G.T., Mavrichev A.S. Morphological and spectrometric studies of the dried blood-drop samples of oncological patients. *J. of BSU. Ser. 1*, 2015, no. 2, pp. 24-30. (In Russ.)]
11. Савков А.В., Сергей М.А., Булойчик Ж.И., Маслова Г.Т., Мавричев А.С., Державец Л.А. Использование морфоструктурного анализа и лазерной атомно-эмиссионной спектрометрии высохших капель плазмы крови для диагностики рака простаты. *Вестник БГУ. Серия 1*, 2016, № 3, с. 51-62. [Savkov A.V., Sergei M.A., Buloichik J.I., Maslova G.T., Mavrichev A.S. The use of morphostructural analysis and laser atomic-emission spectrometry of the dried blood plasma drops for diagnosis of prostate carcinoma. *Vestnik BGU. Ser. 1*, 2016, no. 3, pp. 51-62. (In Russ.)]
12. Ж.И. Булойчик, Г.Т. Маслова, В.В. Корзюк, М.А. Сергей, А.С. Мавричев, Л.А. Державец. Применение атомно-эмиссионной спектрометрии высохших капель плазмы крови в диагностике и лечении опухолей мозга. *Ж. Белгосуниверситета, физика*, 2017, № 2, с. 17-26. [Buloichik J.I., Maslova G.T., Sergey M.A., Korzuk V.V., Mavrichev A.S., Derzhavets L.A. Using of atomic-emission spectrometry of the dried blood plasma drops in diagnosis and treatment of brain tumors. *J. of BSU. Physics*, 2017, no. 2, pp. 17-26. (In Russ.)]

ESTIMATION OF THE ESSENTIAL ELEMENTS CONTENT IN BLOOD OF THE PATIENTS WITH DISEASES OF THE BRAIN USING THE ATOMIC-EMISSION SPECTROMETRY METHODS**Zajogin A.P.¹, Buloichik J.I.¹, Nechipurenko N.I.², Patapovich M.P.³, Pashkovskaya I.D.²**¹Belorussian State University

Nezalieznasci Av., 4, Minsk, 220030, Belarus; e-mail: zajogin_an@mail.ru

²Republican Research-Practical Center of Neurology and Neurosurgery

F. Skoryny str., 24, Minsk, 220114, Belarus

³Belorussian State Academy of Communication

F. Skoryny str., 8/2, 220114, Minsk, Belarus

Abstract. With the use of atomic-emission spectrometry, the blood plasma samples from the patients with brain aneurysms have been analyzed. The integrated estimate for metabolism of the essential elements has been given. The enhanced content of aluminum, iron, calcium, zinc and the lowered content of magnesium has been revealed for all the patients both before and after the operation. The revealed microelementoses can affect particular features of the clinical disease course, pointing to the advisability of using complexes for correction of the mineral metabolism in addition to the adopted therapy. The morphology of the dried blood plasma drops has been studied and the structural peculiarities of the drops have been exhibited. For the spatial calcium distribution over the surface and within the layers of the dried blood plasma drops the quantitative results have been obtained. Besides, it has been demonstrated that the use of laser atomic-emission spectrometry enables one to have quantitative estimates of variations in protein centers. This method has shown itself as an effective highly sensitive diagnostic instrument. The obtained experimental data may form the basis for further development of the methods for early detection of disturbances in the functional resources of a human organism enabling selection of timely and adequate rehabilitation measures.

Key words: *atomic-emission spectral analysis, blood plasma, biological fluids, drop morphology, laser atomic-emission spectrometry, spatial distribution of calcium, layer-by-layer analysis.*