

Государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего профессионального образования  
«Красноярский государственный медицинский университет  
имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

КУТЯКОВ

Виктор Андреевич

**КОМПЛЕКСНЫЙ ПОДХОД  
К ОЦЕНКЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ СОЕДИНЕНИЙ СВИНЦА И ЦИНКА  
ПРИ СУДЕБНО-ХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ**

14.03.04 - токсикология

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

**Научный руководитель:**

Доктор медицинских наук, профессор

Салмина Алла Борисовна

КРАСНОЯРСК

2016

**СОДЕРЖАНИЕ**

<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	5
<b>ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	18
1.1. Общие сведения о микроэлементах.....	18
1.2. Механизмы токсичности металлов.....	18
1.3. Токсикокинетика металлов.....	23
1.4. Общие аналитические методы исследования содержания металлов в биологических объектах.....	26
1.5. Критерии выбора методов анализа.....	30
1.6. Выбор объектов для целей судебно-химического исследования.....	32
1.7. Выбор метода пробоподготовки образцов.....	35
1.8. Комплексная оптимизация условий атомно-абсорбционного анализа .....	36
1.9. Токсикологическая характеристика цинка.....	36
1.9.1. Биологические функции цинка.....	37
1.9.2. Концентрация цинка в органах и тканях человека в норме.....	38
1.9.3. Токсичность соединений цинка.....	39
1.9.4. Особенности токсикокинетики цинка.....	40
1.10. Токсикологическая характеристика свинца.....	42
1.10.1. Общие сведения.....	42
1.10.2. Механизмы общетоксического действия свинца на организм.....	43
1.10.3. Токсикокинетика свинца.....	47
1.11. Биомаркеры – биологические индикаторы действия металлов.....	48
1.11.1. Классификация металлотионеинов.....	48
1.11.2. Структура металлотионеинов.....	49
1.11.3. Функции металлотионеинов.....	50
1.11.4. Аналитические методы обнаружения и определения металлотионеинов.....	51
1.12. Судебно-медицинская оценка воздействия металлов	

на организм человека.....	51
1.13. Патоморфологические изменения органов и тканей, вызываемые воздействием соединений свинца и цинка.....	53
<b>ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....</b>	<b>57</b>
2.1 Описание животных.....	57
2.2. Дизайн исследования.....	58
2.3. Описание воздействия на животных. Моделирование острого отравления соединениями свинца и цинка.....	60
2.4. Объекты исследования.....	60
2.5. Отбор, хранение и подготовка биологических проб.....	61
2.6. Унифицированная методика подготовки проб с различной жировой основой к атомно-абсорбционному измерению.....	62
2.7. Подготовка проб при определении ионных форм свинца и цинка в образцах печени и почки.....	63
2.8. Оборудование для пробоподготовки и определения концентрации свинца и цинка.....	64
2.9. Реактивы и вспомогательные материалы.....	66
2.10. Построение градуировочных графиков.....	66
2.11. Выполнение измерений.....	68
2.12. Обработка результатов анализа, расчет содержания элементов в образцах.....	70
2.13. Иммуногистохимическое исследование.....	71
2.14. Гистологическое исследование.....	72
2.15. Валидационная оценка аналитических методик.....	74
2.16. Методы статистической обработки результатов исследований.....	76
<b>ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....</b>	<b>78</b>
3.1. Определение концентрации свинца и цинка методом атомно-абсорбционной спектрометрии.....	78
3.1.1. Результаты подбора условий для исследования.....	78

3.1.2. Результаты определения валового содержания свинца и цинка в объектах исследования.....	80
3.1.3. Результаты проверки правильности и воспроизводимости методики определения свинца и цинка.....	82
3.2. Результаты исследования динамики распределения цинка и свинца в различных органах и тканях крыс.....	84
3.2.1. Распределение цинка.....	84
3.2.2. Распределение свинца.....	88
3.3. Результаты исследования распределения цинка в тканях печени, почек и межклеточной жидкости.....	93
3.4. Результаты исследования воздействия свинца на распределение цинка в органах и тканях крыс.....	93
3.5. Результаты атомно-абсорбционного определения натрия для исследования степени токсического поражения органов животных соединениями свинца.....	96
3.6. Результаты гистологического исследования тканей.....	97
3.6.1. Обзорная микроскопия.....	98
3.6.2. Морфометрическое исследование почки.....	103
3.6.3. Морфометрическое исследование печени.....	105
3.7. Результаты выявления экспрессии металлотионеина иммуногистохимическим методом.....	106
3.8. Заключение.....	111
<b>ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ.....</b>	<b>112</b>
4.1. Применение атомно-абсорбционной спектрометрии в качестве метода доказательной медицины.....	112
4.2. Обсуждение результатов проверки правильности и воспроизводимости методики определения свинца и цинка.....	116
4.3. Динамика накопления микроэлементов в организме экспериментальных животных.....	117

4.4. Связь элементного статуса со структурными изменениями почек и печени.....	120
4.5. Функциональное состояние и морфология органов детоксификации и выведения в зависимости от токсиканта.....	120
4.6. Экспрессия металлотioneина-1 в органах крысы при интоксикации цинком и свинцом.....	123
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....</b>	<b>126</b>
<b>ВЫВОДЫ.....</b>	<b>131</b>
<b>НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....</b>	<b>133</b>
<b>СПИСОК ОСНОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....</b>	<b>134</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>135</b>
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ.....</b>	<b>162</b>

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования

Одной из задач токсикологической химии является разработка методов определения различных токсикантов в биологических объектах для токсикологического и эколого-фармацевтического мониторинга [Арзамасцев А.П., 2005; Большов М.А., 2015]. Применение неорганических элементов в медицине («Elemental Medicine») является быстроразвивающейся областью. Достижения в области биокоординационной химии имеют решающее значение для улучшения дизайна соединений, снижения токсичных побочных эффектов и понимания механизма действия препаратов [Sadler P.J., 1998]. В последние годы в связи с ухудшением экологической обстановки в качестве объектов исследования на тяжелые металлы рассматриваются разнообразные объекты биологического происхождения.

При этом в ряду неорганических элементов одни крайне необходимы для жизнеобеспечения человека и других живых организмов и относятся к так называемым биогенным элементам. Другие вызывают противоположный эффект и, попадая в живой организм, приводят к его отравлению или гибели. Среди металлов-токсикантов выделена приоритетная группа. В нее входят кадмий, мышьяк, никель, ртуть, свинец, цинк и хром как наиболее опасные для здоровья человека и животных. Из них ртуть, свинец и кадмий наиболее токсичны [Большаков А.М., 1997].

Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) назвала свинец одним из 10 химических веществ, вызывающих основную обеспокоенность в области общественного здравоохранения. По оценкам ВОЗ, воздействие свинца вызывает 143 000 смертей в год [ВОЗ, 2013 г.].

Свинец назван одним из приоритетных факторов среды обитания, формирующих негативные тенденции в состоянии здоровья населения

Российской Федерации, вклад которых в увеличение показателя смертности населения по Российской Федерации – в среднем 11,4 % [Государственный доклад, 2013].

В свою очередь, цинк является наиболее важным эссенциальным микроэлементом для организма человека и животных. Цинк по праву считается вторым по значимости микроэлементом для нормального функционирования человеческого организма [Choi D.W., 1998].

Особо стоит отметить факт включения в МКБ-10 (Международная классификация болезней 10-го пересмотра) класс «Токсическое действие металлов (Т56)» и разделов Т56.0 «Токсическое действие свинца и его соединений» и Т56.5 «Цинка и его соединений» [Приказ Минздрава РФ от 27 мая 1997 г. № 170].

Учитывая вышеизложенное, диагностика острых и хронических отравлений тяжелыми металлами, поступающими в организм человека различными путями, в т.ч. в составе лекарственных препаратов и лекарственного сырья, приобретает особую актуальность.

### **Степень разработанности темы исследования**

Судебно-химические (химико-токсикологические) исследования при диагностике отравлений (заболеваний химической этиологии) должны совершенствоваться благодаря оптимизации операций отбора проб биоматериалов, подготовки их к анализу с учетом токсикодинамических и токсикокинетических параметров и природы химических форм определяемых элементов, валидационной оценки методик анализа, адекватной интерпретации полученных результатов [Лузанова И. С., 2008].

Вместе с тем, применяемые в настоящее время методы идентификации и количественного определения металлов при судебно-химическом исследовании объектов биологического происхождения во многом не отвечают современным нормативно-правовым требованиям. Для указанных целей применяются

методики, разработанные в 60-х гг. 20 века. К существенным недостаткам относятся длительность пробоподготовки, отсутствие комплексной оценки результатов химического исследования, унификации методов количественного определения элементов, нормативно закрепленных требований к определению биологического оптимума элементов у лиц, проживающих в различных биогеохимических провинциях.

В практике судебно-химических отделений бюро судебно-медицинской экспертизы методически не закреплены критерии требований к выбору объекта анализа, моменту отбора биопробы и ее количества [Лузанова И.С., 2008].

До сих пор остаются недостаточно разработанными вопросы комплексного исследования проявлений дисбаланса микроэлементов и модифицирующих эффектов при комбинированном поступлении различных концентраций химических веществ разнонаправленного действия [Боев М.В., 2008].

Многие проблемы анализа неорганических веществ в биологических объектах могут быть решены при использовании метода атомно-абсорбционного спектрального анализа. Такие достоинства метода, как чувствительность, высокая стабильность и экспрессность измерений, простота градуирования, сравнительно слабые матричные влияния обусловили привлекательность этого метода анализа и стремительное внедрение его в практику работы многих исследовательских лабораторий [Плахова Л.В., 2012].

Отсутствуют общепринятые значения по естественному содержанию элементов в биологических объектах, которые дадут возможность оценить элементный состав организма с учетом популяционного статуса, возраста, пола и профессиональной деятельности. Кроме того, чтобы адекватно интерпретировать аналитические результаты количественного определения токсикантов в биологических объектах, необходимо четко выработать алгоритм проведения исследований биологических объектов, для чего:

- унифицировать и утвердить способы отбора, хранения и подготовки анализа для каждого вида биологических объектов;



- сформировать и утвердить перечень методик определения токсичных элементов в биологических образцах;

- провести научное исследование элементного состава биологических объектов в зависимости от возраста, пола, региона проживания и профессиональной деятельности [Леонтьева В.М., 2013].

Кроме прямого определения микроэлементов в различных органах, тканях и биологических жидкостях целесообразно определение специфических эффектов, обусловленных их избытком.

Для определения воздействия ионов некоторых тяжелых металлов на организм (маркеров эффектов) используют экспрессию белков - металлотионеинов в тканях. Синтез металлотионеинов (МТ) представляет собой ответ на действие стрессорных факторов физической и химической природы, в том числе тяжелых металлов. В связи с этим весьма актуальным представляется изучение влияния поступления тяжелых металлов из окружающей среды на содержание тяжелых металлов и металлотионеинов в организме человека [Павловская В.В., 2007].

Эти и другие проблемы во многом обосновывают целесообразность и необходимость разработки действенной системы идентификации и определения концентрации микроэлементов - маркеров биологической экспозиции, маркеров эффектов, а также их высоких концентраций при острых и хронических отравлениях (Таблица 1).

Особая актуальность изучения индукции синтеза МТ в настоящее время связана с необходимостью комплексной оценки воздействия тяжелых металлов на организм человека. Таким образом, существует потребность в создании экспериментально подтвержденной концепции такой оценки.

Решение этой проблемы создаст необходимую базу для разработки современных и эффективных методов диагностики воздействия свинца и цинка на человека, возможность их применения при проведении судебно-химических (химико-токсикологических), экологических, эколого-фармацевтических экспертиз.

Таблица 1 - Сравнительная характеристика методического обеспечения токсикологической оценки острых отравлений свинцом и цинком

<b>Существующее</b>	<b>Предлагаемое</b>
Дробный метод анализа на «металлические» яды (только на наличие металлов)	Комплекс методов (определение концентрации элементов, гистологическое, иммуногистохимическое исследования)
<b>Предел определения</b>	
Свинец – 0,02 мг%	0,005 мкг/мл (0,5 мкг%)
Цинк – 5,0 мг%	0,005 мкг/мл (0,5 мкг%)
<b>Методика пробоподготовки</b>	
Навеска образца – 100,0 г	От 0,1 г
Открытая колба Кьельдаля	Закрытая МВ система
Время подготовки – до нескольких рабочих дней	До 40 минут
<b>Идентификация</b>	
Хромогенные, осадочные реакции	Спектральный метод
<b>Методы количественного определения</b>	
Комплексонометрический, фотометрический	Атомно-абсорбционная спектрометрия
Крылова, А. Н. Исследование биологического материала на «металлические» яды дробным методом. – М. : Медицина, <b>1975</b> . – С. 100.	
<b>Требования к отбору образцов для исследования</b>	
«... <u>хроническими</u> соединениями свинца, таллия, мышьяка - волосы, ногти, плоские кости, печень, почку»	Кровь, печень, почка, селезенка - на наличие свинца и цинка
«при подозрении на отравление ядовитым веществом направляют комплекс внутренних органов: содержимое желудка, одну треть печени, желчь, одну почку, а также всю мочу (не более 200,0 мл) и 200,0 мл крови»	
Приказ Минздравсоцразвития РФ от <b>12.05.2010</b> N 346н «Об утверждении Порядка организации и производства судебно-медицинских экспертиз в государственных судебно-экспертных учреждениях Российской Федерации» (Зарегистрировано в	

Перечисленный круг нерешенных вопросов определил актуальность и составил цель и задачи настоящей работы.

### **Цель и задачи**

Цель - разработка научно-обоснованного комплексного методического подхода к оценке воздействия свинца и цинка при судебно-химических экспертных исследованиях.

Для достижения цели сформулированы следующие задачи:

1. Выявить изменение концентрации свинца и цинка в различных объектах экспериментальных групп крыс после введения низких и высоких доз элементов.

2. Выявить информативные индикаторы действия тяжелых металлов на органы-мишени для оптимизации протокола исследования особенностей аккумуляции тяжелых металлов ( $Zn^{2+}$  и  $Pb^{2+}$ ) в различных органах, тканях, крови экспериментальных животных в зависимости от поступающей дозы при лабораторном моделировании.

3. Изучить влияние содержания  $Zn^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  на экспрессию металлотионеина в различных органах и тканях экспериментальных животных.

4. Оценить некоторые характерные морфологические изменения, наблюдаемые в органах экспериментальных животных при воздействии соединений свинца и цинка.

5. Разработать алгоритм эффективной комплексной оценки токсического воздействия свинца и цинка на организм.

### **Научная новизна**

В результате исследования большого количества биообъектов (468), полученных при моделировании острого отравления экспериментальных животных неорганическими соединениями свинца и цинка, предлагается режим

осуществления судебно-химического экспертного исследования, что было теоретически обосновано, экспериментально проверено и подтверждено.

Полученные результаты позволили подготовить рекомендации для судебно-химического исследования биологических объектов на наличие соединений свинца и цинка:

- предложено использовать чувствительный и селективный метод определения свинца и цинка в биологических объектах в широком диапазоне концентраций 0,005 мкг/мл - 1 мкг/мл, обладающий высокой воспроизводимостью и требующий минимума затрат исследуемых объектов и реактивов,

- для реализации задач судебно-химического исследования на наличие свинца и цинка предложен новый алгоритм (экспертно-аналитический метод), основанный на междисциплинарном полифакторном подходе, позволяющий научно-обоснованно снизить степень субъективизма экспертных оценок.

Проведен элементный анализ различных органов и тканей крыс и определены особенности аккумуляции свинца и цинка в данных органах и тканях на фоне избыточного поступления элементов.

Впервые проведен сравнительный анализ сил влияния эссенциального и токсичного микроэлементов на структурные параметры различных внутренних органов экспериментальных животных. Показана статистически значимая роль алиментарного свинца и цинка на морфологические признаки исследуемых органов.

Предложена реализация алгоритмов и методик оценки токсичного влияния свинца и цинка на организм крыс.

Совокупность примененных методик обеспечивает получение синергетического эффекта, повышающего степень доказательности судебно-химических исследований.

Достигнуты результаты, обеспечивающие снижение длительности проведения судебно-химических исследований на наличие свинца и цинка, повышение доказательности результатов.

## **Теоретическая и практическая значимость работы**

Установленные механизмы распределения, действия свинца и цинка на органы-мишени и молекулы-мишени могут стать основой создания инструментария для разработки новых медицинских стратегий и протоколов.

Выявленные дифференциальные диагностические признаки токсического воздействия свинца и цинка создают основу для разработки новых молекулярно-биологических методов для идентификации и количественного определения тяжелых металлов в биологических объектах. Основу ее методологии составляет комплекс химических, физико-химических, иммунохимических, биологических методов.

Значимость данной работы состоит в том, что в результате проведенных экспериментальных исследований сформировано новое направление по комплексной экспертной диагностике воздействия свинца и цинка на организм человека.

Применение полученных результатов дает возможность углубить степень доказательности судебно-химических исследований за счет получения количественных значений экспертных оценок, повысить достоверность проводимых исследований.

## **Методология и методы исследования**

Методология исследования состояла в проведении сравнительного исследования воздействия свинца и цинка в экспериментальных и контрольных группах крыс при введении низких и высоких доз токсикантов, моделирующего патологические состояния у человека на лабораторных животных. В эксперименте изучалось распределение свинца и цинка в различных органах и тканях крыс, оценивались морфологические изменения, наблюдаемые при воздействии соединений свинца и цинка в органах экспериментальных животных, влияние содержания  $Zn^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  на экспрессию металлотioneина в

различных органах и тканях. На основании результатов проведенного эксперимента для оценки воздействия свинца и цинка на организм предложен комплекс физико-химических, иммунохимических, биологических методов. Исследование выполнено с соблюдением всех правил доказательной медицины.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Для острых отравлений свинцом и цинком характерно неравномерное их распределение между органами и тканями, что объясняется особенностями их токсикокинетики, механизмами связывания с лигандами и чувствительными рецепторами. Между поступившей дозой элементов и посмертной концентрацией свинца и цинка в крови, печени, почке, селезенке, головном мозге на молекулярном уровне наблюдается позитивная зависимость «доза-эффект».

2. Интоксикация соединениями свинца и цинка в субтоксических дозах характеризуется наличием признаков патологических изменений в почке и печени, что вызывает нарушение их функциональных возможностей.

3. Однократное воздействие свинца и цинка в субтоксических дозах вызывает экспрессию металлотионеина-1 в органах крыс, что может быть эффективно использовано для диагностики острого отравления соединениями свинца и цинка при проведении судебно-химических исследований.

4. Комплексный подход к оценке острых отравлений свинцом и цинком при проведении судебно-химических исследований основывается на междисциплинарном полифакторном подходе и включает измерение концентрации элементов в различных органах и тканях, оценку экспрессии металлотионеина-1 а также некоторых характерных морфологических изменений, наблюдаемых в органах экспериментальных животных при однократном воздействии соединений свинца и цинка.

### **Степень достоверности исследования**

Степень достоверности определяется достаточным числом исследованных объектов, формированием групп сравнения и контроля, разнообразными адекватными методами исследования, достаточными сроками исследования и корректными методами статистической обработки.

### **Апробация результатов диссертации**

Основные результаты диссертационной работы доложены на 9 Международном Курнаковском совещании по физико-химическому анализу (Пермь, 2009); XX Международной научно-практической конференции (Пенза, 2010); YI Региональной научно-практической конференции, посвященной 80-летию Красноярского государственного педагогического университета им. В.П. Астафьева и 70-летию Красноярского государственного медицинского университета им. В.Ф. Войно-Ясенецкого «Химическая наука и образование Красноярья» (Красноярск, 2012); IX Научной конференции «Аналитика Сибири и Дальнего Востока» (Красноярск, 2012); XX Международной Черняевской конференция по химии, аналитике и технологии платиновых металлов (Красноярск, 2013); 77 итоговой студенческой научно-практической конференции с международным участием (Красноярск, 2013); Научно-практической конференции с международным участием «Современные тенденции и перспективы фармацевтического образования и науки в России и за рубежом» (Пермь, 2013).

### **Внедрение результатов работы**

Результаты исследования внедрены и используются в учебном процессе на кафедрах биохимии с курсами медицинской, фармацевтической и

токсикологической химии, судебной медицины ИПО, научном процессе НИИ молекулярной медицины и патобиохимии государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации, а также при проведении экспертных исследований в КГБУЗ «Красноярское краевое бюро судебно-медицинской экспертизы».

### **Личное участие автора**

Диссертация является самостоятельным трудом, выполненным на кафедре биологической химии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии и в Научно-исследовательском институте молекулярной медицины и патобиохимии ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ. На этапе планирования работы автором сформулированы цель и задачи, поставленные перед исследованием, определены объем работы и методы исследования, разработан дизайн исследования. Автор лично принимал участие во всех этапах выполнения работы: в моделировании отравления животных металлами, заборе материала для исследования, определении концентрации металлов в объектах, проведении гистологического и иммуногистохимического исследований. Результаты атомно-абсорбционного определения металлов получены совместно с проф. В.Н. Лосевым, доц. Н.В. Мазняк, асп. А.П. Верхотуровой (ФГАОУ ВПО Сибирский Федеральный университет); результаты гистологического и иммуногистохимического исследований получены совместно с доц. Е.Л. Жуковым (НОЦ «Морфология и физиология здорового человека» КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого), доц. Л.А. Шестаковой (кафедра патологической анатомии им. проф. П.Г. Подзолкова КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого). Диссертантом проведены статистическая обработка и анализ полученного материала, поиск и



критический анализ литературы по теме диссертации, написание публикаций и оформление диссертации, внедрена в практическую деятельность судебно-химического отделения предлагаемая методика определения свинца и цинка.

### **Связь задач исследования с проблемным планом токсикологической науки**

Диссертационная работа выполнена по плану научно-исследовательских работ ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации по теме № 01200807481 «Молекулярная и трансляционная медицина».

Диссертационное исследование соответствует проблематике работ, осуществляемых по приоритетным направлениям развития токсикологической науки, в части изучения взаимодействия химических веществ и живых организмов, причин возникновения отравлений, поведения токсикантов в организме, их влияния на различные органы и системы, разработки методов диагностики отравлений и заболеваний химической этиологии. Решение этих задач актуально для развития токсикологии, токсикологической химии, а также прогресса в разработке новых аналитических подходов для решения прикладных задач судебно-химической (химико-токсикологической) экспертизы, совершенствования, унификации и валидации существующих методов исследования соединений свинца и цинка.

### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 12 печатных работ, в том числе 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ для опубликования результатов исследований, выполненных на соискание ученой степени кандидата биологических наук.

## **Объем и структура диссертации**

Материал диссертации изложен на 165 страницах машинописного текста, иллюстрирован 35 рисунками, 19 таблицами. Работа состоит из введения, глав: обзор литературы; материалы и методы исследования; результаты собственных исследований; обсуждение полученных результатов; выводы; список литературы, приложение. Список литературы содержит 271 источник, в том числе 116 отечественных и 155 зарубежных. В приложение включены акты о внедрении.

## ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Общие сведения о микроэлементах

Изменение содержания химических элементов отражается в концентрации элементов в организме человека, что может приводить к возникновению патологических состояний. К сожалению, в РФ нет четких указаний на обязательность элементного анализа при медико — диагностических исследованиях [Игнатова Т.Н. и др., 2010]. Полный элементный состав организма человека до сих пор остается неизученным, и по-прежнему актуальны слова великого ученого В.И. Вернадского: «Главным недостатком в настоящее время является отсутствие полного элементарного химического количественного анализа живого вещества...» [Вернадский В.И., 1960]. По словам известного русского патолога и физиолога А.П. Авцына, микроэлементы — «скорее всего, не случайные ингредиенты тканей и жидкостей организмов, а компоненты закономерно существующей, очень древней и сложной физиологической системы, участвующей в регулировании жизненных функций на всех стадиях развития» [Авцын А.П. и др., 1991]. Влияние металлов на здоровье людей известно уже несколько столетий, в частности, в связи с действием ядовитых тяжелых металлов – Рb (“сатурнизм”), Hg (“меркуриализм”, или “болезнь Минамата”), Cd (“итаи-итаи”).

Два микроэлемента, являясь жизненно необходимыми, играют важнейшие роли в метаболизме: Ca и Zn. Первый из них – “главный неорганический мессенджер”, а второй – “главный неорганический гормон” [Барашков Г.К., 2008].

### 1.2. Механизмы токсичности металлов

Отрицательный эффект взаимодействия токсичных металлоионов с биологически активными макромолекулами связан со следующими процессами:

- вытеснением необходимых металлов из их активных мест связывания токсичным металлом;
- связыванием части макромолекулы, необходимой для нормальной жизнедеятельности организма;
- сшиванием с образованием биологических агрегатов, вредных для организма;
- деполимеризацией биологически важных макромолекул;
- неправильным спариванием оснований нуклеотидов и ошибками в белковых синтезах [Eichhorn G.L., 1974]. Токсические эффекты металлов в своей основе связаны с двумя главными механизмами действия: формирование ковалентных связей с этими группами металлы, ингибирующие активность ферментов или нарушающие целостность клеточных мембран; конкуренция и замещение эссенциальных катионов [Калетин Г.И., 2006; Бингам Ф.Т. и др., 1993].

Токсический эффект воздействия металлов обусловлен взаимодействием с клеточной мишенью [Панченко Л.Ф. и др., 2004]. Такими мишенями являются неспецифические биохимические процессы и (или) клеточные, субклеточные мембраны, органеллы клетки. В результате нарушаются нормальные функции соответствующих клеток и тканей в организме, и наступает отравление, которое в ряде случаев заканчивается смертью [Зинина О.Т., 2001].

Механизмы токсичности свинца подробно исследованы на клеточном и субклеточном уровнях [Tsuchiya, K., 1978]. Ионы  $Pb^{2+}$  связываются с сульфгидрильными, фосфатными и карбоксильными группами мембраны, увеличивают ее жесткость и снижают устойчивость к осмотическому шоку [Lessber M.A. et al., 1973].

Изучение эпителиальных клеток нефронов показало, что один из основных путей накопления свинца в клетке — образование внутриядерных включений. В цитозоле имеются белки, которые инициируют образование включений свинца, конкурирующее с первичным эффектом его воздействия на эпителиальные

клетки. Таким эффектом является атака на клеточную и митохондриальную мембраны [Fowler B.A., 1991; Oskarson A. et al., 1982].

Большую роль в токсических проявлениях свинца играет его содержание в костях. Установлены, в частности, корреляция уровня свинца в костях и частота развития нефропатии, а также других патологических проявлений [Needleman H.L. et al., 1979; Rosen F., 1983].

Функциональными выражениями токсичности необходимых металлов могут быть специфические биологические функции: фиксация азота, фотосинтез, метаболизм кремниевой кислоты, рост, питание, воспроизводство, поведение [Бингам Ф.Т. и др., 1993].

Молекулярными мишенями воздействия ионных или атомных форм металлов служат различные системы и белки (Таблица 2):

- гемсодержащие белки и ферменты;
- системы пероксидного и свободнорадикального окисления липидов и белков;
- системы антиоксидантной защиты;
- ферменты транспорта электронов и синтеза АТФ;
- белки клеточных мембран и ионные каналы мембран.

Таблица 2 - Молекулярные мишени воздействия свинца и цинка

<b>Мишень воздействия</b>	<b>Свинец</b>	<b>Цинк</b>
Гемсодержащие белки и ферменты	Основными мишенями токсичности свинца являются гемсинтезирующие ферменты, тиолсодержащие антиоксиданты и ферменты (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа и антиоксидантные молекулы - GSH). [Nemsadze K. Et al., 2009] Свинец, замещая цинк в дегидратазе 5-аминолевулиновой кислоты, ингибирует синтез гема [Токсикологическая химия, 2010].	Ингибирует активный центр каспаз 3,6,9, запускающих начальные этапы апоптотического процесса [Maret W., 2011].
Системы окисления липидов и белков	Интенсификация окислительного стресса вследствие снижения активности каталазы, которое можно отнести к снижению всасывания железа или ингибированию биосинтеза гема [Sharma, R., 2013].	
Системы антиоксидантной защиты	Изменяет молекулярную структуру и деятельность супероксиддисмутазы,	Связывается с белками, участвующими в антиоксидантной защите (металлотионеин,

	глутатиопероксидазы, каталазы, снижая антиоксидантную защиту [Patra, R. C., 2011].	Cu/Zn супероксиддисмутаза) [Sharif R., 2012].1
Ферменты транспорта электронов и синтеза АТФ	Ингибирование креатин- и пируваткиназы (in vitro) [Lepper TW, 2010]. Воздействие свинца затрагивает, главным образом, специфические белковые комплексы: протеинкиназу С и N-метил-D-аспартат подтип глутаматных рецепторов [Marchetti C., 2003].	Ингибирует $Ca^{2+}$ -АТФазу в эритроцитах, [Maret W., 2011]. Связывается с активными центрами, трёх аминокислот: гистидин, глутамин, цистеин [Wang D., 2012].
Белки клеточных мембран и ионные каналы мембран	Способность заменять другие поливалентные катионы (Ca, Zn) в ионных каналах мембран – один из наиболее важных факторов, способствующих развитию нейротоксичности свинца [Garza, A. 2006].	Связывание со специфическими металлсвязывающими белками – металлотионеинами [Токсикологическая химия, 2010].

### 1.3. Токсикокинетика металлов

Поступление металлов зависит от перепада градиента концентрации через клеточные мембраны [Wood J.M., 1984]. Скорость поступления металлов в организм обычно пропорциональна концентрации свободного иона, а не общей концентрации металла [Boergmann U., 1983]. Образующиеся комплексы обычно не поглощаются организмом. Механизм поступления металлов быстр и эффективен [Steeman-Nielsen E., 1970]. Хелатирование и образование белковых соединений преобразует токсичные ионы металлов в нетоксичные формы, подходящие для проникновения металла, его транспорта и депонирования [George S.G., 1982]. Поддержание гомеостаза по отношению к металлам - динамический процесс [Бингам Ф.Т. и др. 1993; Барышева, Е. С., 2008].

После абсорбции токсикант поступает в кровь, лимфу или другие жидкости организма. Кровь представляет основной транспортер для переноса токсикантов и их метаболитов. Некоторые токсиканты переносятся элементами крови - прежде всего эритроцитами и реже лейкоцитами. Токсиканты могут абсорбироваться поверхностью эритроцитов либо связываться с лигандами стромы. Внутри эритроцита они могут связываться с гемом или глобином. За перенос цинка конкурируют эритроциты и плазма. Около 96% свинца переносятся эритроцитами.

Во время абсорбции существует равновесие между концентрацией токсиканта в крови, тканях и органах. Выделение снижает концентрацию токсиканта в крови и может вызвать мобилизацию токсиканта из тканей в кровь. Здесь различают две группы компартментов: 1) система быстрого обмена - в этих компартментах концентрация токсиканта в ткани аналогична его концентрации в крови; 2) система медленного обмена, где концентрация токсиканта в ткани выше, чем в крови из-за связывания и аккумуляции - жировая ткань, скелет и почки могут временно удерживать ряд токсикантов, например мышьяк и цинк [Rainbow P. S., 2006].



Фармакокинетическая модель для химических веществ в организме человека, в т.ч. металлов, представлена на рисунке 1.

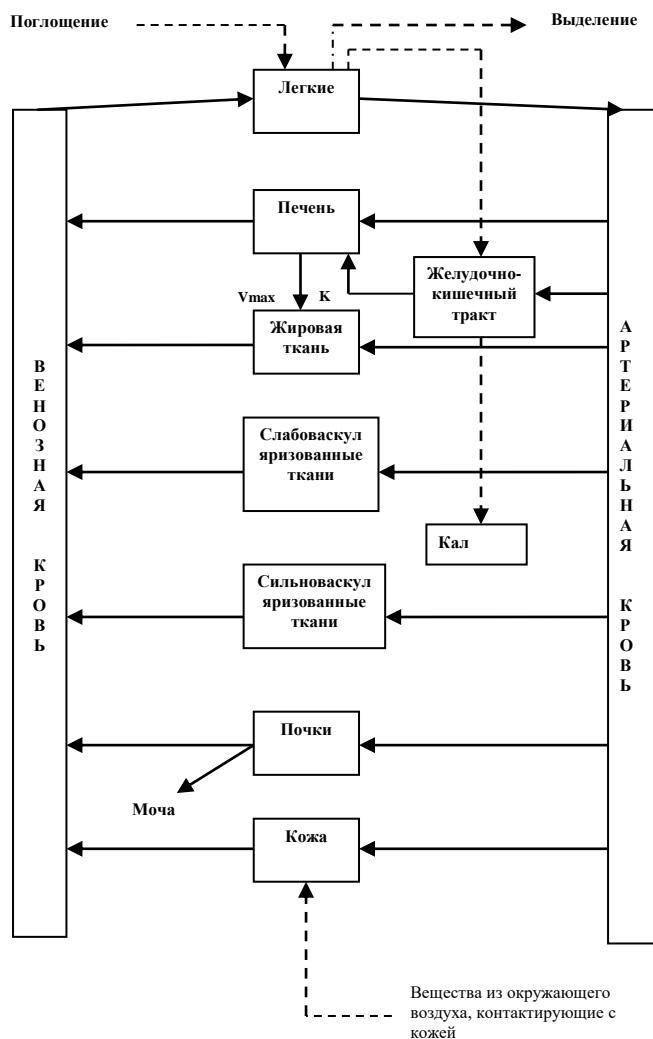


Рисунок 1 - Концептуальное представление фармакокинетической модели для химического вещества (по Krishnan et al., 1994)

**Особенности биотрансформации металлов (отличие от органических веществ):**

1. Металлы и их соединения часто ионизированы, для их транспорта в ткани требуются особые механизмы.

2. Метаболизм обычно ограничивается реакциями алкилирования/деалкилирования.

3. Часто изолированные, металлы связываются со специфическими белками плазмы или тканей, или депонируются в неактивной форме.

4. Элиминируются в основном экскрецией, поскольку имеют малые размеры молекул и гидрофильны.

5. Эссенциальные металлы обладают механизмом гомеостаза, что позволяет поддерживать их оптимальную концентрацию в тканях.

6. Взаимодействия между металлами и металлами и органическими соединениями разнообразны и наблюдаются в течение абсорбции, распределения и экскреции [Vijver Martina G., 2007].

Схема метаболических процессов металлов в организме (Рисунок 2).

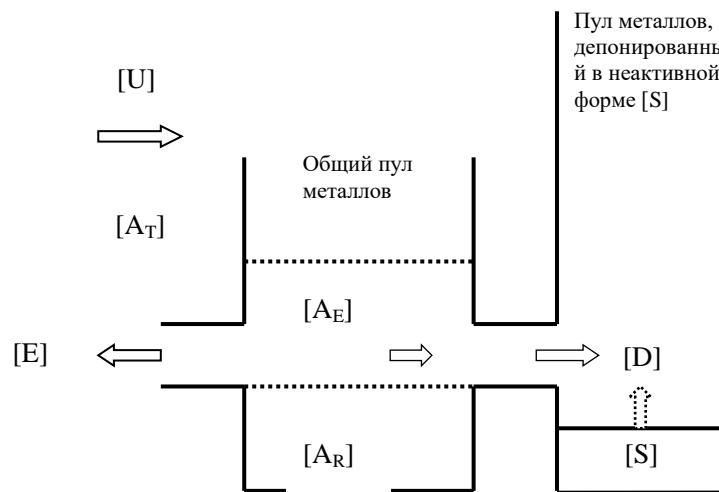


Рисунок 2 - Схема метаболических процессов металлов в организме (по Rainbow P. S., 2006)

$U$  – общее поступление,

$E$  – общее выделение,

$S$  – часть, депонированная в неактивной форме,

$D$  – детоксицированный пул металлов,

$A_R$  – пул металлов, поступаемый после метаболизма,

$A_E$  – пул, обуславливающий токсичность металлов,

$A_T$  – общий пул металлов, имеющийся в организме

#### **1.4. Аналитические методы определения концентрации металлов в биологических объектах**

В число многочисленных областей применения аналитических методов определения химических элементов в биологических образцах входит медицина. Главной задачей всегда является выбор наиболее подходящих для целей исследования биосубстратов и методов анализа [Скальный А. В. и др., 2012].

Определение микроэлементов в образцах складывается из нескольких стадий: пробоподготовка, собственно аналитические процедуры, статистическая обработка и интерпретация полученных результатов.

**Методы пробоподготовки.** Пробоподготовка при определении в биосредах соединений металлов сводится к их извлечению из матрицы, очистке, получению производных [Другов Ю.С., 2007]. Применяемые в рутинной практике методы изолирования можно подразделить на две группы: методы «сухого» озоления и методы «мокрого» озоления, или «мокрой» минерализации [М.Д. Швайкова, 1975; Белова А.В., 1976; Крамаренко В.Ф., 1982].

**Метод микроволнового разложения.** Наиболее перспективным способом разложения проб является кислотная минерализация с использованием микроволновой техники. Разложение в микроволновом поле может проводиться в открытых и закрытых сосудах. Однако закрытые системы для кислотного разложения обладают рядом преимуществ, а именно:

1. Достигаются более высокие температуры, поскольку температура кипения кислоты увеличивается в условиях повышенного давления, соответственно, время, необходимое для разложения, уменьшается.

2. Практически устраняются потери летучих элементов.

3. Уменьшается расход кислот, поскольку отсутствует испарение, нет необходимости добавлять кислоту, что может привести к загрязнению исследуемого раствора.

4. Газообразные вещества, образующиеся в процессе разложения, остаются в сосуде, поэтому не приходится работать с вредными газами [ГОСТ 26929-94; Джесси Л.Б., 1991].

**Аналитические методы определения металлов в биологических объектах.** Для идентификации и количественного определения металлов в биологических объектах предложено множество методов:

Атомно-абсорбционная спектрометрия (пламенная (ААС), с электротермической атомизацией (ЭТААС));

Оптическая эмиссионная спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой (ИСП-ОЭС) или плазменная атомно-эмиссионная спектрометрия (АЭС-ИСП);

Масс-спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой (ИСП-МС);

Пламенная фотометрия;

Рентгенофлуоресцентная спектрометрия;

Нейтронно-активационный анализ;

Гамма-резонансная спектрометрия;

Спектрофотометрический метод;

Электрохимические методы (инверсионная вольтамперометрия, ионометрия, полярография и др.);

Хроматографические методы (ВЭЖХ, система ВЭЖХ-МС и др.);

Иммунохимические и другие методы [Назаров Г.Н., 1994].

**Современные методы, применяемые для количественного определения химических элементов в биологических образцах**

Эти методы можно подразделить на химические (гравиметрия, титриметрия) и физико-химические: электрохимические, хроматографические, спектрометрические.

Спектрометрические методы анализа основаны на регистрации испускания или поглощения квантов электромагнитного излучения атомами или молекулами исследуемого вещества. Принципиальной основой этих методов является тот факт, что каждый вид атомов, реагируя на энергетическое воздействие, дает

характерный, присущий только ему энергетический ответ [Скальный, А. В. и др., 2012].

Химико-токсикологические исследования при диагностике отравлений (заболеваний химической этиологии) и медико-криминалистические экспертизы, включающие определение металлов выстрела при огнестрельных повреждениях, должны совершенствоваться благодаря оптимизации операций отбора проб биоматериалов, подготовки их к анализу с учетом токсикодинамических и токсикокинетических параметров и природы химических форм определяемых элементов, валидационной оценки методик анализа, адекватной интерпретации полученных результатов [Плахова Л.В., 2012]. Для определения элементного состава биообразцов спектральные методы на протяжении нескольких десятилетий успешно применяются в химико-токсикологических и медико-криминалистических исследованиях [Назаров Г.Н., 1994; Saber-Tehrani M., 2007; Reichl F.X., 2006; Андрусина, И. Н., 2009; Антонович, В. П., 2006; Стойкова, Е. Е., 2010]. Эмиссионный спектральный анализ, пламенная фотометрия, атомно-абсорбционная спектрометрия (ААС), атомно-эмиссионная спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой (АЭС-ИСП) используются для диагностики отравлений «металлическими» ядами, лекарственными средствами неорганической природы, а также для определения следов металлов при огнестрельных повреждениях кожи [Лузанова И.С., 2008].

Необходима разработка экспресс-методов с использованием минимального количества биоматериала. Методы должны отличаться высокой селективностью, низким пределом обнаружения и высокой информативностью (надежностью) получаемых результатов, обеспечивающих удовлетворительные метрологические характеристики. В этом отношении современные инструментальные методы анализа низких концентраций элементного состава биообразцов (в частности, эмиссионно-спектральный, атомно-эмиссионный с индуктивно-связанной плазмой, масс-спектральный метод атомно-абсорбционной электротермической атомизации) при соответствующей отработке аналитических приемов определения на фоне сложного высококомпонентного состава матрицы пробы

дают хорошие метрологические параметры (точность, прецензионность) [Плахова Л.В., 2010; Зайцева Н.В. и др., 2004].

При определении цинка могут применяться вышеописанные методы. Поскольку цинк содержит заполненную  $d$ -орбиталь ( $3d^{10}4s^0$ ), то его определение в объектах биологического происхождения чаще всего проводится методом атомно-абсорбционной спектрометрии [Allan R.E., 1978; Szpunar, C. B., 1978; Alvarado J. 1991; Arnaud J., 1991; Fan, J., 1991; Плахова Л.В., 2010].

Атомно-абсорбционный анализ принадлежит к числу относительных методов, для которых концентрация определяемого элемента оценивается по градуировочной кривой, построенной по стандартным растворам (эталонам).

При этом используют следующие основные способы определения концентрации анализируемого элемента в пробе:

1. Метод градуировочного графика. 2. Метод добавок. 3. Метод ограничивающих растворов [Алемасова А. С. и др., 2003, Волынский А. Б., 2001].

Для правильного выбора метода требуется понимание основных принципов каждого метода, его возможностей и ограничений, а также знание требований, предъявляемых к проводимому анализу: необходимая чувствительность определения элементов, рабочий диапазон определяемых концентраций, количество анализируемых образцов, качество получаемых данных и т.д. Необходимо отметить, что ЭТААС характеризуется меньшей скоростью анализа по сравнению с ААС. Кроме того, в графитовой печи перечень определяемых элементов несколько уже, чем в случае атомной абсорбции в пламени. Однако лучшая чувствительность метода ЭТААС и используемые для его осуществления малые объемы проб значительно расширяют возможности атомной абсорбции.

### 1.5. Критерии выбора метода анализа

К важнейшим критериям выбора того или иного метода относятся:

- пределы обнаружения;
- рабочий аналитический диапазон концентраций;

- производительность;
- качество результатов;
- затраты;
- аналитические помехи;
- простота эксплуатации;
- доступность проверенных методик.

**Пределы обнаружения.** Пределы обнаружения, которые могут быть достигнуты для конкретных элементов, имеют существенное значение при определении эффективности того или иного метода, в зависимости от чего могут потребоваться дополнительные усилия по предварительному концентрированию анализируемой пробы – Таблица 3 [Забокрицкий М. П., 2014].

Таблица 3 - Пределы обнаружения элементов спектрально-аналитическими методами (мкг/л) (Забокрицкий М. П., 2014)

Элемент	ААС	ЭТАСС	ИСП-ОЭС	ИСП-МС
Pb	15	0,05	1	0,00004
Zn	1,5	0,02	0,2	0,0003

При оценке токсического воздействия свинца и цинка на организм лабораторных животных современный высокочувствительный и селективный метод их определения в биосредах повышает достоверность получаемых результатов исследования, информативность, обоснованность оценки воздействия на организм, в т.ч. при однократном остром воздействии. Это достигается за счет устранения матричного влияния, использования схемы пробоподготовки образцов, учитывающих все мешающие влияния [Гилева, О. В., 2014].

**Прочие критерии.** Основные потребительские свойства рассмотренных методов даны в таблице 4.

Среди инструментальных методов исследования свинца и цинка наибольший интерес представляет атомно-абсорбционная спектрометрия (ААС), как наиболее экспрессный, селективный и чувствительный [Гилева О. В., 2014].

Таблица 4 - Основные потребительские свойства методов атомной абсорбции (Забокрицкий М. П., 2014)

Метод	Преимущества	Ограничения	Применение
ААС	Очень прост в эксплуатации; широко распространен; доступна обширная информация по приложениям; относительно недорог	Низкая чувствительность; одноэлементный анализ; невозможность работы без оператора (горючий газ)	Предназначен для лабораторий, анализирующих большое число образцов при ограниченном количестве элементов; пригоден для определения основных компонентов и высоких концентраций элементов
ЭТААС	Исключительные пределы обнаружения; хорошо разработанные приложения; возможна автономная работа	Ограниченный рабочий диапазон; производительность несколько ниже, чем у других методов	Предназначен для лабораторий, определяющих ограниченное количество элементов с высокими требованиями к пределам обнаружения

## 1.6. Выбор объектов

### для целей судебно-химического исследования

В клетках живых организмов эссенциальные и токсичные металлы могут присутствовать в виде ионных и молекулярных неорганических форм, алкилированных форм, соединений с аминокислотами, углеводами, нуклеиновыми кислотами, белками и другими биогенными соединениями. Результаты определения содержания форм элементов, получаемые при выполнении вещественного анализа биологических объектов, позволяют не только оценить источники и пути поступления элементов в организм, но и установить закономерности транспорта, распределения, биотрансформации элементов в организме, что важно при решении задач токсикологии,



фармакологии, биохимии, клинической и экологической химии [Иваненко Н. Б. и др., 2012].

Общей проблемой идентификации и определения как экзогенных, так и эндогенных форм является контроль качества измерений, так как наиболее надежным способом доказательства правильности полученных результатов является анализ стандартного образца состава исследуемого объекта. Однако стандартные образцы состава клинических образцов, важных с точки зрения диагностики и изучения метаболизма элементов в живых организмах (моча, кровь, спинномозговая жидкость, ткани, волосы и др.), с аттестованными значениями концентрации химических форм элементов практически отсутствуют [Иваненко Н. Б. и др., 2012].

В число многочисленных областей применения аналитических методов определения химических элементов в биологических образцах входит медицина. Главной задачей всегда является выбор наиболее подходящих для целей исследования биосубстратов и методов анализа.

В последнее время все больший интерес для выявления состояния обмена макро- и микроэлементов в организме и токсического воздействия отдельных тяжелых металлов представляет исследование волос. Во многих отношениях волосы являются благоприятным материалом для такого рода исследований и имеют ряд преимуществ: проба может быть получена без травмирования больного, для хранения материала не требуется специального оборудования, волосы не портятся и сохраняются практически без ограничения во времени [Скальный А. В., и др., 2012].

Наиболее информативными для целей гигиенической диагностики следует считать ткани или органы, которые вовлечены в процессы «хранения» (депонирования) и аккумуляции (концентрирования) элементов.

Кратковременные по экспозиции и значительные по степени отклонения элементного статуса изменения отражены в их концентрации в жидких средах организма, тогда как твердые ткани (волосы, ногти, кости) представляют элементный статус, формирующийся в течение длительного времени (месяцы,

годы) и более пригодны для целей клинической и гигиенической донозологической диагностики [Скальный, А. В. и др., 2012].

Выбор биосубстрата (объекта) определяется следующими основными условиями:

- адекватностью (установлением корреляционной зависимости содержания самого вещества или его метаболитов именно в данном субстрате с уровнем экспозиции);

- доступностью и простотой (отбор проб биосубстрата не должен быть опасен для здоровья работающего);

- достаточной устойчивостью при хранении для возможности осуществления серийных анализов;

- возможность применить несколько методов исследования образца, включая аналитические, гистологические, иммунные и другие [Токсикологическая химия, 2010].

Наиболее широко используемым биологическим материалом, который отвечает большинству указанных требований, является кровь. Кроме этого, биосубстратами могут служить также волосы (шерсть животных), селезенка, головной мозг, печень, почка. Выбранные для исследования ткани, с одной стороны, отражают специфичность депонирования и органотропность действия металлов, а с другой – позволяют косвенно характеризовать этапы их фармакокинетики (всасывание в кишечнике, поступление после всасывания по портальной системе в печень, формирование плазменных, эритроцитарных и тканевых депо).

Традиционно кровь относят к одному из самых информативных объектов, быстро реагирующих на любые изменения, происходящие как на клеточном уровне, так и в организме в целом, поэтому анализ её имеет первостепенное диагностическое значение [Гилева О. В., 2014].

Существующим нормативным документом (Приказ Минздравсоцразвития России от 12 мая 2010 г. № 346н) утвержден порядок отбора объектов для исследования при подозрении на отравление соединениями свинца, таллия,

мышьяка (хроническое): отбирают волосы, ногти, плоские кости, печень, почку; однако не регламентирован перечень объектов, подлежащих исследованию при подозрении на отравление соединениями цинка, а также при остром отравлении соединениями свинца.

### **1.7. Выбор метода пробоподготовки образцов**

Пробоподготовка проб занимает около 80% времени всего анализа. Применение хлористоводородной кислоты нецелесообразно из-за возможности образования окислов хлора, вносящего значительный вклад в аналитический сигнал. Высокая температура кипения серной кислоты делает затруднительным её разрушение, кроме того, серная кислота при сгорании образует полиатомные ионы, которые могут привести к завышению результата. Для разложения биологических образцов и последующего хранения используют азотную кислоту по причине простого фонового спектра.

При разложении биологических субстратов в концентрированных кислотах необходимо контролировать концентрацию кислоты в растворе, поскольку минеральные кислоты с концентрацией выше 2% вызывают подавление сигнала.

Стадия разложения пробы является определяющей. Выделяют два методических подхода к элементному анализу биологических объектов: с минерализацией пробы и без её разложения. Прямой анализ проб позволяет исключить появление возможных систематических погрешностей на стадии минерализации, существенно упрощает и ускоряет анализ.

При сухом озолении происходит потеря высоколетучих элементов, среди которых свинец, цинк. В методе мокрой минерализации использование окислителей может привести к загрязнению пробы. Учитывая вышеизложенное, при проведении измерения концентрации свинца и цинка использовался современный и эффективный способ пробоподготовки – микроволновое разложение.

Микроволновое разложение биосубстратов значительно уменьшает объем (массу) пробы, минимизирует матричное влияние, существенно затрачивает время, необходимое для перевода образцов в анализируемый раствор [Гилева О. В., 2014].

Применяемая в эксперименте программа микроволнового вскрытия апробирована при измерении натрия и калия в биологических объектах [Мазняк, Н. В. и др., 2012 б].

### **1.8. Комплексная оптимизация условий атомно-абсорбционного анализа**

Обобщая результаты многочисленных исследований, У. Славин в 1981 г. сформулировал так называемую концепцию «стабилизированной по температуре печи с платформой» (концепция STPF) для устранения зависимости результатов анализа в графитовых печах от состава анализируемых проб. Эта концепция представляет собой совокупность следующих приемов:

- применение платформы Львова;
- модификация матрицы;
- скоростной нагрев печи (не менее 1500 град/с);
- применение безынерционной системы регистрации;
- интегрирование сигнала поглощения;
- использование режима «газ—стоп» в момент регистрации сигнала;
- использование Зеемановского корректора неселективного поглощения.

Некоторые из этих приемов требуют пояснений.

**Модификация матрицы.** Температурная программа печи позволяет отделять определяемый элемент от сопутствующих компонентов на стадии пиролиза. При этом выгодно использовать максимально возможную температуру пиролиза.

Определяемый элемент в анализируемой пробе может находиться в форме самых различных химических соединений. Они могут существенно различаться по своим физическим свойствам, от которых зависит их летучесть в процессе

пиролиза. Чтобы устранить эту неопределенность и по возможности сблизить физические и химические свойства анализируемой пробы и градуировочных образцов, применяют различного рода химически активные добавки. Этот прием получил наименование химической модификации матрицы. Целью данной процедуры является создание условий, при которых определяемый элемент и сопутствующие компоненты могли бы быть разделены на стадии пиролиза. Эффективность тех или иных добавок оценивается по различию максимально допустимых температур пиролиза без модификатора и в его присутствии [Соловьев, Н. Д., 2012].

Критерием выбора модификатора является максимальный аналитический сигнал при минимальном относительном стандартном отклонении результатов анализа ( $S_r$ ) [Иваненко Н. Б. и др., 2014].

К числу наиболее часто применяемых модификаторов относятся: смесь нитратов магния и палладия (палладий-магниевый модификатор), непосредственно палладий в элементном состоянии, нитрат магния, фосфат аммония и ряд других. Из них наибольшей популярностью пользуется палладий-магниевый модификатор, оказывающий положительное действие для нескольких десятков определяемых элементов в самых различных матрицах [Соловьев, Н. Д., 2012].

Преимущества – палладий сам определяется не часто (поэтому не важен эффект памяти), доступен очень чистый палладий, эффективно действует при определении большого числа элементов. Механизм действия палладиевого модификатора матрицы, заключается в образовании термостойких твердых растворов или интерметаллидов с определяемым элементом. Предполагается, что палладий, образующийся при взаимодействии водных растворов с углем, катализирует восстановление соединений аналитов графитом атомизатора при сравнительно низких температурах. Образующийся элемент растворяется в палладии – в результате нет потерь от возгонки летучих соединений (оксидов, хлоридов и проч.) аналита. Это предположение доказано экспериментально [Бейзель Н. Ф., 2008].

## 1.9. ТОКСИКОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЦИНКА

У человека ион  $Zn^{2+}$  входит в состав свыше 200 металлоферментов, включая участвующие в метаболизме нуклеиновых кислот. Значительная часть ионов  $Zn^{2+}$  в крови найдена в эритроцитах в качестве необходимого кофактора для фермента карбоангидразы. Большая часть  $Zn^{2+}$  в теле человека находится в его мышцах, а самая высокая концентрация цинка – в простате. Цинк по праву считается вторым по значимости микроэлементом для нормального функционирования человеческого организма [Choi D.W., 1998]. Общее содержание цинка в организме составляет 1,4-2,3 г (30 ммоль), из них 60% находится в мышцах, 30% - в костной ткани, 10% - в других тканях.

### 1.9.1 Биологические функции цинка

1. Активирует более 200 ферментов, участвующих в обмене белков, нуклеиновых кислот, углеводов и липидов, выступает как кофактор более 80 ферментов.

2. Необходим для образования т.н. «цинкового пальца» — важного домена в ряде белков, регулирующих действие стероидных и других липофильных гормонов и транскрипцию в целом.

3. Играет важную роль в поддержании и развитии иммунного статуса, абсолютно необходим для развития и функционирования Т-лимфоцитов.

4. Матриксные металлопротеиназы — Zn-энзимы, разрушающие белки соединительной ткани (коллагеназы, желатиназы, эластазы, протеогликаназы и др.), необходимы при овуляции, эмбрио-, морфо- и ангиогенезе, ремоделировании матрикса для миграции клеток и роста аксонов, инволюции матки, заживлении раны, а также при метастазировании.

5. В ЦНС выполняет роль нейромодулятора. В зависимости от концентрации может вызывать апоптоз или некроз (например, при ишемии мозга) [Северин Е.С., 2003; Зайчик А.Ш., 2001; Ткачук В.А., 2002; Кольман Я., 2000; Кон

Р.М., 1986; Кулинский В.И., 2004; Литвицкий П.Ф., 2002; Мартинчик А.Н. и др., 2002; Маршалл В.Дж., 1999; Уайт А. и др., 1981; Цыганенко А.Я., 2002; Н. Тиц, 1997; Murray R.K., et al., 2003].

### 1.9.2. Концентрация цинка в органах и тканях человека в норме

Цинк, введенный в организм, накапливается в печени и поджелудочной железе, выводится главным образом через желудочно-кишечный тракт, в меньшей степени с мочой. В органах человека наибольшие количества цинка содержатся в печени: 5,4-14,5 мг%, почках – 5,5 мг%, волосах – 16,3 мг%, костях – 10,1 мг% [Гадаскина И.Д., 1975]. В норме концентрация цинка в плазме (сыворотке) крови – 1 мкг/мл [Elinder S. G., 1986]. Средняя концентрация цинка в ногтях – 129-179 мкг/г [Hayashi et al., 1993; Wilhelm et al., 1991], в волосах – 102-258 мкг/г [Folin et al., 1991; McBean et al., 1971; Provost et al., 1993; Wilhelm et al., 1991]. Между концентрацией цинка в плазме крови и волосах не выявлено устойчивой корреляционной связи, при увеличении общего цинкового пула его концентрация в волосах не изменяется [McBean et al., 1971; Rivlin, 1983].

Дробным методом определен цинк в печени 2,73—6,71 мг/100 г, в почках — 1,76—6,16/100 г. По Н.А.Горбачевой (1961) концентрация в печени 3,36—6 мг/100 г, в почках 2,61— 5,28/100 г, в стенке желудка 0,5—2,9/100 г, в стенке кишечника 1,03—2/100 г. В цельной крови 38—82/100 г, в эритроцитах — 153—168/100 г, в плазме крови 15,3—30,6 мкмоль/л, в волосах и ногтях — 15 и 10 мг/100 г соответственно, в женском молоке — 0,65—5 мг/л. Концентрация цинка в сыворотке крови 17 добровольцев составила 0,66 – 1,02 мг/л, в эритроцитах – 12,25 мг/л [Kosman D.J., 1979]. Посмертная концентрация цинка в крови людей – 6,5 – 14,8, в печени – 56,0 – 65,8, в селезенке – 17,2 -30,1 мкг/мл (г) [Lech T., 2009; Rahil-Khazen R., et al., 2002; Rahil-Khazen R., 2000; Barany E., et al., 2002].

### 1.9.3. Токсичность соединений цинка

«Металлическая» лихорадка - основной эффект, наблюдаемый у рабочих, контактируемых с парами или пылью цинка окиси [Blanc et al., 1991; Brown, 1988; Drinker P. et al., 1927; Vogelmeier et al., 1987]. Пероральный прием соединений цинка высокой концентрации вызвал анемию, уменьшил уровни ЛПВП, повреждение поджелудочной железы у людей (гроздевидный некроз клетки, метаплазия, фиброз, панкреатит) [Black et al., 1988; Chandra, 1984; Chobanian S. J., 1981; Hooper et al., 1980; Murphy, 1970; Maita et al., 1981, Aughey et al., 1977 Drinker et al., 1927, Straube et al., 1980; Allen et al., 1983; Kazacos E. A., 1989; Lü et al., 1990] и животных [Allen et al., 1983; Aughey et al., 1977; Drinker et al., 1927; Katya-Katya et al., 1984; Klevay.,1973; Maita et al., 1981; Straube et al., 1980]. Отмечено увеличение уровня амилазы и липазы сыворотки [Murphy, 1970; Chobanian, 1981].

Комитет по пище и сельскому хозяйству совместно с Комитетом экспертов по пищевым добавкам ВОЗ [WHO Tech. Rep. Ser., 1982] считают максимально переносимым ежедневным поступлением Zn 1 мг/кг массы тела.

Хлорид цинка при остром и подостром воздействии обладает мутагенным эффектом в соматических клетках (клетки костного мозга), вызывая образование хроматидных; хромосомных aberrаций и полиплоидию клеток, индуцирует образование аномальных форм половых клеток (сперматозоидов); вызывает накопление клеток костного мозга с признаками повреждения цитоскелета и биомембран (блеббинг), развития апоптоза и некроза [Владимцева Т. М., 2003].

#### **Механизмы общетоксического действия цинка на организм**

Проявление токсичности при вдыхании соединений цинка связывают с формированием аллергической реакции [McCord, 1960; Mueller E.J., 1985]. Механизм воспаления поджелудочной железы не выявлен [Black et al., 1988; Chandra, 1984; Chobanian, 1981; Hooper et al., 1980; Murphy, 1970]. Анемию и повышение уровня ЛПВП связывают с дефицитом меди, индуцированным цинком (Fischer et al. 1980; Katya-Katya et al. 1984; Klevay, 1973; Murthy,1976).



Смертельная доза солей цинка при приеме внутрь составляет около 5,0 г. Соединения цинка оказывают местное токсическое действие на слизистую кишечника, заключающееся в нарушении всасывания глюкозы и раздражающем эффекте в виде усиления секреции ферментов энтероцитами, хлорид цинка обладает общерезорбтивным действием в виде панкреотоксического эффекта [Здольник Т.Д. и др., 1997].

#### **1.9.4. Особенности токсикокинетики цинка**

Мышцы и кости содержат до 90% общего цинка (около 60 и 30% соответственно [Wastney et al., 1986]. Концентрация цинка может значительно колебаться у разных индивидуумов [Forssen, 1972] и может возрастать в печени, поджелудочной железе, простате и снижаться в матке и аорте с возрастом, достигая максимума в почках и сердце к 40-50 годам [Schroeder et al., 1967].

Цинк в основном локализуется в эритроцитах (до 87% находится в карбоангидразе [Ohno et al., 1985]. В плазме крови до 2/3 цинка связано с альбуминами [Bentley, 1991; Giroux et al., 1976; Wastney et al., 1986]. Адренкортикотропный гормон (АКТГ) оказывает регулирующее действие на уровень цинка в печени, стимулируя секрецию глюкокортикоидов, те, в свою очередь активируют ген, стимулирующий экспрессию металлотионеина (МТ) [Failla, 1978]. МТ, связывая цинк, регулирует его уровень в крови. Цинк слабо проникает через плацентарный барьер – до 3% за 2 часа [Beer et al., 1992], возможно, за счет активизации калий/цинковой транспортной системы [Aslam, 1992].

Плазма является основным транспортером цинка [Cousins, 1985]. Чаще цинк образует комплексы с органическими лигандами, реже находится в ионизированном состоянии [Gordon et al., 1981]. При выдыхании его соединений цинк выводится с мочой [Hamdi E. A., 1969], при пероральном введении основная часть - через кишечник [Davies N. T., 1975; Reinhold J. G. et al., 1991; Wastney et al., 1986], остальная – с мочой [Wastney et al., 1986]. Отмечена линейная

зависимость фекальной экскреции цинка от его количества в пище крыс [Ansari et al., 1975]. Разные формы соединений цинка не влияют на его экскрецию [Sealand, C. J., 1983].

В кишечнике цинк образует соединения с белками и другими лигандами [Cousins, 1985; Nemepe, 1992]. Вне кишечника на абсорбцию цинка оказывают влияние аминокислоты, простагландин  $E_2$  [Song M. K. et al., 1992], а также ингибиторы – кадмий, медь, кальций, железо [Hamilton et al., 1978; Harford, 1991; Ogiso et al., 1979; Spencer et al., 1992; Yoshida et al., 1993].

После поступления в организм цинк концентрируется в печени, постепенно распространяясь по органам и тканям. При высокой концентрации цинка в плазме стимулируется экспрессия МТ, который способствует удерживанию цинка гепатоцитами [Richards, 1975].

Схема обмена цинка в организме представлена на рисунке 3.

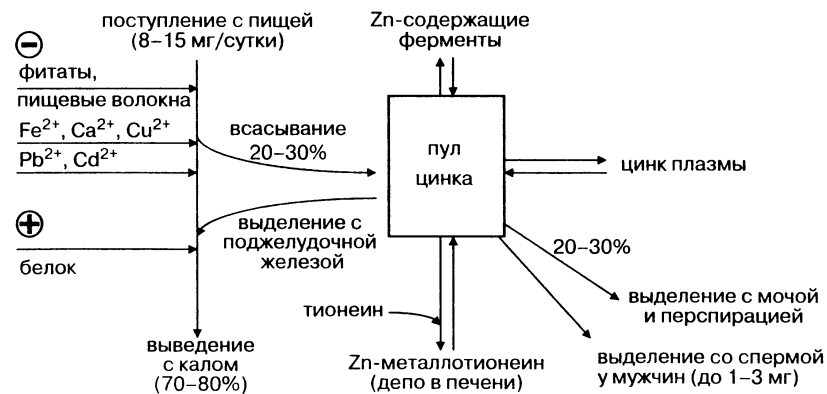


Рисунок 3 - Обмен цинка в организме (А.В. Скальный, 2004)

## 1.10. ТОКСИКОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СВИНЦА

### 1.10.1. Общие сведения

Свинец является одним из металлов, включенных в список приоритетных загрязнителей рядом международных организаций, в том числе ВОЗ. По степени общетоксического действия свинец занимает четвертое место после таллия, ртути, кадмия [Явербаум П.М., 2006]. В последние годы свинец относят к наиболее распространенным токсикантам из группы тяжелых металлов в России [Снакин В.В., 1999; Prasher D., 2009], который широко применяется во многих областях промышленности [Karrari P. et al., 2012].

В связи с тем, что определению свинца в биосубстратах придается большое диагностическое значение, остро стоит вопрос о его «нормальном» содержании и экскреции. За верхний предел «нормы» принято считать 30-40 мкг свинца в 1 л мочи. Пределом безвредной для организма концентрации свинца в моче считается 200 мкг/л [Stewart C.P., 1960].

Свинец — яд, влияющий на нервную систему, кровь и сосуды; подавляет ферментативные процессы превращения порфиринов и инкорпорацию железа в протопорфирин с образованием гема [Свинец: МРПТХВ, 1984].

В течение жизни организм человека аккумулирует от 50 до 350 мг свинца, до 90% которого депонируется в костях, незначительная часть экскретируется в ногти, волосы, с мочой. У мужчин концентрация свинца обычно немного выше, чем у женщин. Концентрация свинца в норме у здоровых людей (Таблица 5).

Таблица 5 - Концентрация свинца в норме (мг/л (кг)) (Barry, 1975)

Объект	Головной мозг	Печень	Почка	Волосы	Моча
Концентрация	0,10	1,0	0,78	6,6	0,04

### 1.10.2. Механизмы общетоксического действия свинца на организм

Известно, что свинец способен накапливаться в организме, вызывая широкий спектр негативных эффектов: поражение кроветворной, нервной, пищеварительной, выделительной и других систем [Атчабаров, Б.А., 1966; Бёккельман И., 2001; Корбакова А.И. и др., 2001; Ландриган Ф., 1991; Снакин В.В., 1999; Явербаум П.М., 2006; Ronnback L., 1992; Ахметзянова Э. Х., 2006].

Одним из важных механизмов токсического действия свинца на организм является его способность приводить к окислительному стрессу [Annabi V. A., et al., 2007]. Активация перекисного окисления липидов (ПОЛ) является наиболее важным фактором повреждения мембран при острых экзогенных отравлениях [Столяров И.Д. и др., 1998]. Свинец способен инициировать процессы свободно-радикального окисления, приводя к усилению липопероксидации, что обусловлено снижением активности каталазы и супероксиддисмутазы [Adonaylo V.N., 1999; Flora G., et al., 2012; Patil A.J., et al., 2006].

Кроме активизации процессов ПОЛ в мембранах клеток свинец вызывает окисление молекулы гемоглобина. Увеличение уровня аминолевулиновой кислоты вследствие ингибирования фермента дегидратазы дельта-аминолевулиновой кислоты (ALAD) вызывает генерацию перекиси водорода и супероксидного радикала. Эта кислота также взаимодействует с оксигемоглобином, приводя к увеличению продукции гидроксильных радикалов [Bechara E.F., 1996; Patrick L., 2006 (b)]. Механизм действия свинца по типу конкурентного ингибирования связан с его способностью замещать бивалентные ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ) и моновалентные ( $\text{Na}^{+}$ ) катионы, оказывая влияние на различные биологические процессы в организме [Lidsky T.I., 2003].

Свинец за счет его способности замещать ионы цинка, являющиеся кофакторами ферментов антиоксидантной защиты супероксиддисмутазы и каталазы, приводит к инактивации этих ферментов [Flora G. et al., 2012]. Показано, что свинец воздействует на концентрацию ионов натрия, которые ответственны за многие жизненно важные функции [Bressler J. Et al., 1999].

Установлено, что повышенное поступление свинца в организм приводит к нарушению обмена других микроэлементов [Явербаум П.М., 2006]. В механизме действия свинца важная роль отводится энзимопатическому эффекту. Свинец соединяется с сульфгидрильными, карбоксильными и аминными группами активных центров ферментов [Измеров Н.Ф., 2000; Корбакова А.И. и др., 2001; Ergal N. et al., 2001]. Многочисленные публикации отражают разные аспекты токсического действия свинца как на периферическую, так и на центральную нервную систему детей и взрослых. Действие свинца часто оказывалось фатальным и почти всегда необратимым [Buchthal F., 1979; Калетина Н.И., 2007]. Известно, что свинец нефротоксичен, он оказывает действие на кровяное давление через ренин-ангиотензиновую систему, а также на мужскую и женскую репродуктивные системы [Kostial K., 1957; Manalis R.S., 1973].

Свинец блокирует *SH*-группы белков, образуя комплексы с фосфатными группами рибозы у нуклеотидов, и тем самым быстро разрушает РНК, ингибирует ферменты, в частности, карбоксипептидазу [Торчинский Ю.М., 1977; Тиунов Л.А. и др., 1981; Зинина О.Т., 2001].

О. Паризель (O. Parisel) и К. Гурлауен (C. Gourlaouen) предложили оригинальную модель токсичности свинца: 1) снижение эффективности переноса кальция кальмодулином, обусловленное искажением всей белковой структуры после замены иона кальция на ион свинца (Рисунок 4, вверху); 2) замена цинка на свинец в активном центре ALAD нарушает нормальный порядок образования крови и ведет к анемии за счет неконкурентного ингибирования белка (Рисунок 4, внизу) [Gourlaouen C., 2007].

Свинец и его соединения опасны кумулятивностью терапевтического эффекта [Плотко Э.Г., и др., 1978; Ullm. Encycl. Technisch. Chemie., 1977], высоким коэффициентом накопления в организме [Горшков В.В. и др., 1980], малой скоростью и неполнотой выделения с продуктами жизнедеятельности [Киселев В.Б. и др., 1980; Golimowsky J., et al., 1979]. Степень токсичности зависит от концентрации, физико-химического состояния и природы соединений

свинца. Токсичность соединений свинца растет симбатно их растворимости в биологических жидкостях организма [Лазарев Н.В., 1977].

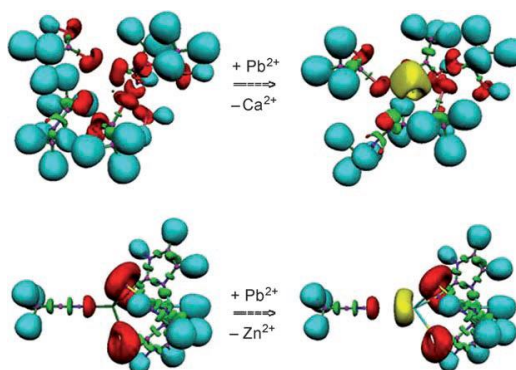


Рисунок 4 - Вверху: модель комплекса кальмодулина с Ca<sup>2+</sup>, (слева) и Pb<sup>2+</sup> (справа). Внизу: модель комплекса ALAD для Zn<sup>2+</sup> (слева) и Pb<sup>2+</sup> (справа) (По С. Gourlaouen, O. Parisel, 2007)

Нейротоксическое влияние свинца может быть трактуемо как единственное, действующее вне связи с другими факторами риска [Virgolini M.V. et al., 2005; Kim, Jong-Neon., 2012].

Есть основания полагать, что синдром, развивающийся при хроническом токсическом воздействии свинца, также является митохондриальной болезнью. Так, в работе С.М. Volin с соавт. [Volin С.М. et al., 2006] доказано, что окислительное повреждение ДНК нервных клеток при воздействии свинца также связано с возникновением нейродегенеративных болезней. Показано, что продолжительный контакт со свинцом способствует возникновению болезни Альцгеймера, связанной с образованием бета-амилоидного пептида. Предполагается, что изменения уровня белка *Brn-3a* могут играть ключевую роль в механизмах развития свинцовой нейротоксичности [Chang W., et al., 2006; Chen J., et al., 2004].

**Действие на периферическую и центральную нервную систему.** При воздействии высоких концентраций свинца отмечаются «свинцовый паралич», или даже кома («свинцовая энцефалопатия») [Buchthal F., 1979; Seppalainen A.M., et al., 1975]. Механизм такого действия свинца неизвестен, но, по всей видимости, он не включает ни дегенерацию аксонов, ни демиелинизацию [Buchthal F., 1979]. И

ганглиозный, и нервно-мускульный постсинаптические потенциалы сильно подавляются свинцом; этот эффект становится обратимым под действием кальция и обуславливается ингибированием высвобождения ацетилхолина [Kostial K., 1957; Manalis R.S., 1973] или выделением норэпинефрина в симпатических нервных окончаниях [Cooper G.P., 1977].

Эксперименты на животных [Fox D.A., 1979] свидетельствуют о том, что воздействие свинца вызывает изменения возбудимости коры головного мозга.

При хронической интоксикации свинцом наблюдаются функциональные, органические поражения ЦНС и поражения периферической нервной системы с развитием свинцовой полиневропатии [Грацианская Л.Н., 1961]. При уровне больше 50 мкг/100 мл в крови свинец влияет на мембраны эритроцитов, вызывая агрегацию низкомолекулярных белков с образованием высокомолекулярных комплексов и фрагментацию крупных белков [Apostoli et al., 1999].

Несмотря на то, что острые отравления свинцом редки, смерть может наступить на 1-2 дни после приема взрослым человеком 10-30 г соединения свинца. Описан случай смерти женщины после приема 7 г свинца ацетата, концентрация свинца в крови при этом составила 2,28 мг/л [Karpatkin, 1961].

Распределение свинца по тканям и органам у детей, умерших от отравления свинцом (Таблица 6).

Таблица 6 - Концентрация свинца в смертельных случаях (мг/кг) (Кеное, 1971)

Объект	Головной мозг	Печень	Почка	Плоские кости	Трубчатые кости
Концентрация	5,8	40	8,8	268	132

Таким образом, свинец относится к ядам политропного действия, инициирует окислительный стресс, ингибирует антиоксиданты и оказывает энзимопатический эффект. Это предопределяет многообразие патогенетических механизмов развития и течения острой и хронической свинцовой интоксикации.

### 1.10.3. Токсикокинетика свинца

Основными путями поступления свинца в организм человека из объектов внешней среды являются ингаляционный и энтеральный [Измеров Н.Ф., 2000; Patrick L., 2006 (a); Hallen et al., 1995, Oskarsson et al., 1995]. Rabinowitz et al. предложили трёхкомпарментную модель метаболизма свинца, где центральным компарментом является кровь, периферическими – мягкие ткани (быстрый период полувыведения – 28 дней) и твердые ткани (медленный период полувыведения – до 10.000 дней) [Rabinowitz et al., 1976] (Рисунок 5).

Независимо от пути поступления свинца в организм, за 2-3 недели выделяется около половины дозы. Выведение происходит с мочой и калом примерно в отношении 1:2. Экскреция, характеризующаяся периодом полувыведения 70 дней, отвечает выведению из костей. Из тканей выделяется ионный свинец, затем свинец, лабильно связанный, и только в последнюю очередь свинец, образующий органические комплексы [Castellino N., 1964].

Показана избирательность различных тканей к отложению свинца: значительное количество металла обнаружено в жировой ткани, мышцах, костях, печени и селезенке [Явербаум П.М., 2006].

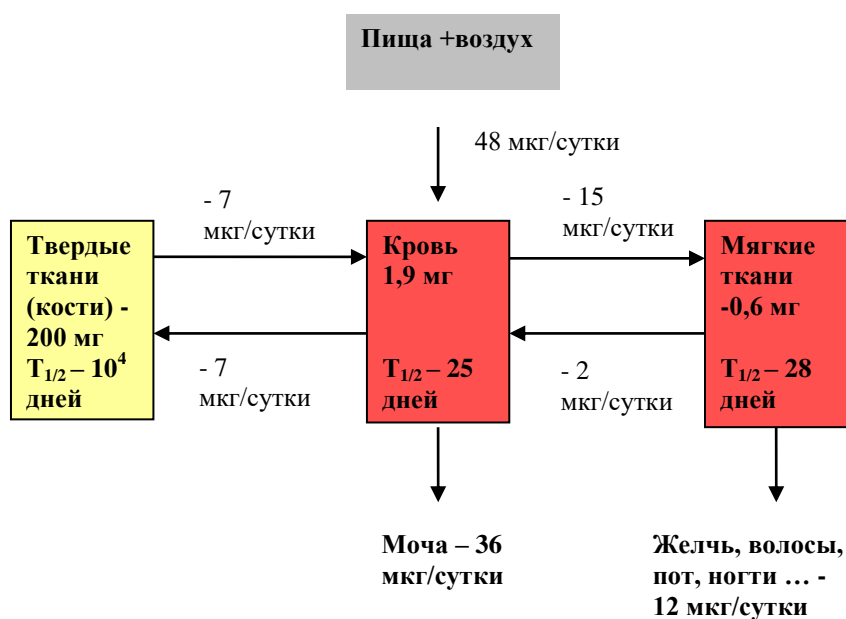




Рисунок 5 - Трёхкомпарментная модель метаболизма свинца (Rabinowitz et al., 1976).

### **1.11. Биомаркеры – биологические индикаторы действия металлов**

Эффекты воздействия металлов на организм отражают т.н. *биомаркеры*.

Биомаркеры подразделяются на 3 группы: биомаркеры воздействия, эффекта и чувствительности.

Специфичными биомаркерами воздействия свинца и цинка являются повышение концентрации этих металлов в крови и моче и соответственно ингибирование  $\delta$  – аминолевулиновой кислоты и индукция металлотioneина (МТ). В связи с новейшими достижениями в области иммунохимических методов анализа МТ может стать наиболее достоверным маркером воздействия металлов на организм человека [Gil F., 2001; Sharma R., 2013].

#### **Универсальный биомаркер воздействия металлов – металлотioneин.**

Токсичные металлы и гены, которые они индуцируют, ассоциируются с клеточной гибелью и окислительным стрессом. Биологические системы выработали различные защитные пути. Одним из вариантов такой защиты являются металлотioneины, способные утилизировать и аккумулировать тяжелые металлы [Громова О. А., и др. 2005; 271.Zalewska, M., 2014].

МТ были открыты Маргошем и Велли (Margoshes, Vallee) в 1957 году как новые протеины, выделенные из почки лошади [Margoshes M., 1957], впервые описаны Kagi и Vallee в 1960 году. Эти белки широко встречаются в животном мире. Похожие белки экспрессируются бактериями, грибами и растениями. МТ являются белками с низкой молекулярной массой (от 2 до 16 кДа), уникальны обилием остатков цистеина (на 30% больше в отличие от всех других аминокислот) [Blindauer C.A.. 2008].

#### **1.11.1. Классификация металлотioneинов**

Классификация МТ представляет определенную сложность, существуют различные трактовки. У млекопитающих были идентифицированы четыре основные изоформы (МТ-1 - МТ-4) [Carpene et al., 2007]. Изоформа МТ-1 кодируется 11 генами (МТ-1А, МТ-1В, МТ-1Е, МТ-1F, МТ-1G, МТ-1Н, МТ-1I, МТ-1J, МТ-1K, МТ-1L, МТ-1X), тогда как каждая из других изоформ кодируется 1 геном [Ryvolova M. et al., 2011; Mehus A., 2014]. Несмотря на схожесть физико-химических свойств изоформ МТ, их биологическая роль и локализация в тканях различны. МТ-1 и МТ-2 являются наиболее широко распространенными изоформами, экспрессируются во всех типах мягких тканей, МТ-3 экспрессируется, в основном, в ткани мозга, а также в сердце, почках, репродуктивных органах [Hozumi I. et al., 2008], МТ-4 обнаружен в эпителиальных клетках. Апопротеин МТ (МТ без иона металла) обнаруживается в клетках, обедненных цинком. Поздними исследованиями эта изоформа была обнаружена в опухолевых клетках [Ryvolova M. et al., 2011].

### 1.11.2. Структура металлотioneинов

Изначально МТ идентифицировались как белки, богатые цистеином. Сайт связывания металла в МТ содержит 20 остатков цистеина, соседствующих с лизином и аргинином, которые локализованы в двух насыщенных остатками тиогрупп местах, названных *a* и *b* [Skutkova H. et al., 2012]. Все МТ имеют сходную пространственную структуру - гантелеподобная форма с двумя отдельными белковыми доменами - тетраэдрическими Me(II)-Cys единицами [Пыхтеева Е. Г., 2009]. Третичная структура МТ сильно варьирует и зависит от наличия иона металла (двухвалентных ионов металлов), связанных с сульфгидрильными группами остатков цистеина, представлена двумя отдельными областями: С-концевой  $\alpha$ -домен (аминокислоты 31-61) и N- концевой  $\beta$ -домен (аминокислоты 1-30), соединенные между собой.  $\alpha$ -домен содержит 11 цистеиновых остатков,  $\beta$ -домен содержит 9 фрагментов цистеина, способных связывать три двухвалентных или шесть одновалентных ионов металла при

формировании гексан-подобного кластера [Skutkova H. et al., 2012]. При отсутствии ионов металла образуется апотионеин (APO-T), преимущественно неструктурированный. Модели МТ-2/3 млекопитающих с фрагментами цистеина показаны на рисунке 6.

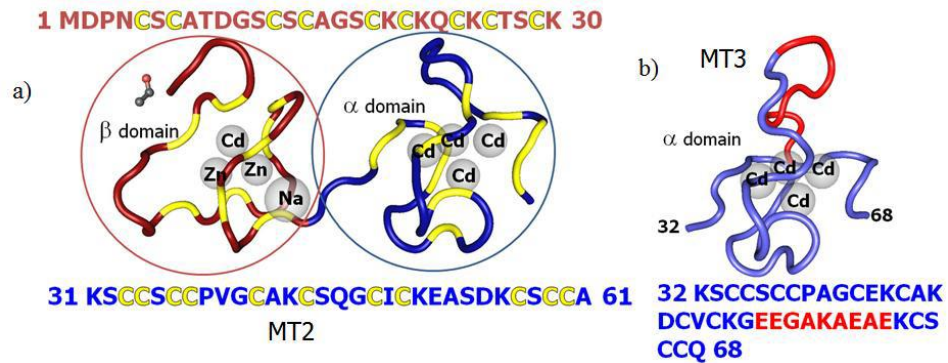


Рисунок 6 - а) третичная структура МТ крыс с ионами металлов. Домены отмечены синим ( $\alpha$ -домен) и красным ( $\beta$ -домен). Цистеин отмечен фрагментами желтого; б) Молекулярная структура МТ-3. Вставки цистеина в первичной структуре выделены красным (Skutkova, H. et al., 2012)

### 1.11.3. Функции металlothioneинов

Основными функциями МТ в организме являются транспорт ионов металлов, поддержание окислительно-восстановительных реакций и протекторные функции. Связывание тяжелых металлов в различные бионеорганические комплексы происходит мгновенно при введении металлов в организм любым способом и в любой концентрации [Шафран Л. М., 2003]. Это связывание носит динамический характер, т.е. металл «мигрирует» из соединений с меньшей прочностью связывания к тем соединениям, связывание с которыми наиболее крепко [Пыхтева Е. Г., 2009]. МТ обоснованно считаются белками, включенными в детоксификацию эссенциальных и неэссенциальных металлов [Egli D. et al., 2006; Ruttkay-Nedecky, B., 2013; Conga, W., 2014].

В исследовании Formigari A. и др. подчеркнуты защитные эффекты цинка и комплекса цинк-МТ при обусловленном медью и железом оксидантном стрессе и наблюдаемом при этом апоптозе [Formigari A., 2007].

#### **1.11.4. Аналитические методы обнаружения и определения металлотионеинов**

Выделение МТ проводят обычной хроматографией. Методом гель-фильтрационной колоночной хроматографии цитозоля удается выделить МТ из общей массы растворимых белков [Cousins R.J., 1983].

Электрохимический метод исследования МТ с применением пульсовой полярографии описан Olafsson (1991), разделение и определение МТ методом высокоэффективной жидкостной хроматографии описано Suzuki (1992).

Для установления локализации МТ в клетках печени и почки крыс предложена техника непрямого иммунопероксидазного окрашивания. Окрашивание наблюдалось во всех гепатоцитах и большинстве почечных трубчатых клеток. В гепатоцитах животных, подвергнутых воздействию кадмия, наблюдалось интенсивное окрашивание. Наличие МТ было также замечено вне клеток в пределах синусоидов печени и почечных трубочек и у нормальных, и у подвергнутых воздействию кадмия животных, обозначая транспорт и экскрецию этого белка [Danielson K.G., 1982].

#### **1.12. Судебно-медицинская оценка воздействия металлов на организм человека**

Вышеприведенные данные (п.п. 1.4; 1.5) свидетельствуют о значительных трудностях, возникающих при судебно-медицинских исследованиях жидкостей, тканей и органов трупа. В связи с этим решение вопроса о повышенном содержании конкретных химических элементов в различных объектах, взятых из трупа, не могут базироваться на приведенных в литературе концентрациях этого элемента у «стандартного человека». В судебно-медицинской экспертизе оценка результатов должна проводиться при сравнительном исследовании сопоставимых между собой объектов [Назаров Г.Н., 1994].

Главной задачей судебно-химических исследований является выбор наиболее подходящих для целей исследования объектов, биомаркеров и методов анализа. Наиболее информативными объектами воздействия металлов следует считать ткани или органы, которые вовлечены в процессы их «хранения» (депонирования) и аккумуляции (концентрирования).

Норма содержания МЭ в организме варьирует иногда весьма в широких пределах. В частности, в судебной медицине в силу её довольно специфичных задач, речь может идти в основном только о данных физиологического разброса содержания микроэлементов в различных органах, тканях и выделениях человека с учетом значительного числа факторов. Причем, такой разброс данных об элементном составе не может быть использован во всех случаях в качестве «нормы» при проведении судебно-медицинских экспертиз.

Особенность судебно-медицинских исследований заключается в том, что к ним предъявляются строгие и весьма определенные требования:

- выбор системы исследования,
- тщательность подбора объектов,
- объективность оценки сравниваемых данных и т.д.

Результаты, полученные при определении элементного состава биосред человека и других объектов, находят практическое применение и могут быть использованы при:

- проведении медико-криминалистических и судебно-химических экспертиз (идентификация личности, установление причин смерти),
- определении степени тяжести причиненного вреда здоровью, [Калетина Н.И., 2004].

Изучение публикаций в журнале «Судебно-медицинская экспертиза» за период 2004-2013 г.г. показало, что метод ААС относится в судебно-медицинской экспертной деятельности к «редким»: 1 публикация, а качественные и количественные определения при проведении судебно-химических исследований не проводились [Орлова А. М., 2015].

### **1.13. Патоморфологические изменения органов и тканей, возникающие при воздействии соединений свинца и цинка**

При острых свинцовых отравлениях макроскопически отмечаются выраженные изменения в головном мозге в виде гиперемии мозговых оболочек, мелких кровоизлияний, микроскопически – резко выраженные изменения в супраоптических ядрах вокруг полости третьего желудочка, в области олив продолговатого мозга, в зубчатом ядре мозжечка, а также значительные изменения со стороны сосудов (гипотония, множественные периваскулярные кровоизлияния). Для поражения мозга типичны острое набухание нервных клеток, явления тигролиза, липоидная дистрофия в различных структурах мозга; иногда наблюдается отек легких, пневмонии, редко – геморрагические инфаркты легких.

Отравления свинцом длительное время могут иметь скрытое течение. Свинец – яд политропного действия, он вызывает ряд патологических явлений со стороны многих органов и систем. Свинец вызывает существенные нарушения функции почек: олигурию, иногда анурию, выраженную альбуминурию. Неизменно наблюдается выраженное нарушение функции печени, возможны изменения со стороны сердца, сосудистой системы [Ганжара П.С., 1979].

У крыс, которые получали соли меди, цинка и железа на протяжении 1 месяца, отмечалось неравномерное увеличение размеров кардиомиоцитов (КМЦ): в одном и том же поле зрения встречались указанные клетки разных размеров (гипертрофированные и нормальных размеров). У крыс, которые получали соли цинка, хрома и свинца на протяжении 3 месяцев, отмечали нарушение ориентации мышечных волокон, участки их фрагментации. В изученных полях зрения встречалась дистрофия КМЦ: контуры клеток нечеткие, цитоплазма неравномерно окрашена, зернистая, поперечная исчерченность участками не визуализировалась [Погорелова О. С., 2008].

В современной литературе отсутствуют данные, свидетельствующие о развитии токсической нефропатии в ответ на воздействие свинца, которая

морфологически характеризуется как токсичный тубулоинтерстициальный нефрит [Пухлев А., и др., 1980; Зербино Д. Д., 1994; Kim J.Y., et al., 1998]. По классификации ВОЗ тубулоинтерстициальный нефрит входит в раздел «Тубулярные и тубулоинтерстициальные повреждения, вызванные тяжелыми металлами» [Seshan S.V., et al., 1999]. Основанием для этого отнесения является нефронекроз, развивающийся в ответ на воздействие соединений свинца.

Функциональные и биохимические аспекты нефротоксичности свинца отражены во многих публикациях [Шафран Л. М., и др., 2004; Шафран Л. М., 2006], в то время как структурным (на клеточном и субклеточном уровнях) изменениям почек не уделяется внимания.

Данные морфометрических исследований (Шафран Л.М. и др., 2004) свидетельствовали, что изменения плазматической мембраны эпителия проксимальных канальцев почек при воздействии свинца характеризуются зависимостью «эффект-доза-время».

Функциональное значение выявленных изменений в ответ на воздействие свинца состоит в том, что они:

1 – характеризуют первичный ответ клеток, обусловленный взаимодействием свинца с апикальной мембраной;

2 – указывают на пути транспорта свинца в цитоплазму клеток (эндоцитоз и дефекты структуры апикальной мембраны), а также элиминацию металла из клеток (экзоцитоз);

3 – свидетельствуют о нарушении обмена и циркуляции жидкости в клетках, что вызывает набухание клеток;

4 – указывают на развитие патологии клетки, которая характеризуется дефицитом поверхности цитоплазмы мембраны («минус мембрана») [Шафран Л. М., и др., 2004].

Известно, что образование внутриядерных включений в разных типах клеток наблюдается при старении в нейронах коры головного мозга и подкорковых структур, при алкогольной интоксикации в кардиомиоцитах, вирусных инфекциях и других патологических состояниях.

Образование внутриядерных включений объясняется проникновением свинца через ядерную мембрану цитоплазму [Beaver D. L., 1961], где он взаимодействует с белками ядер и образует белковый комплекс. При хроническом воздействии свинца образование мембранных включений в ядрах почечных эпителиоцитов может быть объяснено с позиций окислительного стресса, который инициируется свинцом, что, в свою очередь, вызывает уменьшение ядерного хроматина с образованием в ядрах отдельных очагов парциального некроза, разделенных одинарной гидрофильной мембраной [Губский Ю. И., 2001; Трахтенберг И. М. и др., 2001; Трахтенберг И. М. и др., 2002].

Воздействие свинца характеризуется изменениями ультраструктуры митохондрий, что выражается в гипертрофии, гиперплазии и набухании. Набухание митохондрий характеризует интенсивность синтеза и выделения в цитоплазму АТФ [Авцын А. П., 1979; Аруин Л. И., и др., 1997]. При воздействии свинца отмечается увеличение полиморфизма митохондрий, проявляющееся переходом органелл из ортодоксальной в конденсированную конфигурацию и наоборот. Отмечен также пул молодых митохондрий, отличающихся округлой формой, небольшими размерами, наличием в них поврежденного матрикса и одиночных коротких крист.

Нефротоксичность свинца при воздействии на организм крыс проявляется также эффектом дистрофических и деструктивных изменений, развивающихся в эпителии проксимальных канальцев. Изменения всегда сопровождались выраженной гиперплазией лизосом, которые играют значительную роль в процессах токсикокинетики и токсикодинамики свинца [Шафран Л.М. и др., 2004; Шафран Л.М., 2006]. Такие характеристики лизосомальных ультраструктур, их количество и частота выявления в эпителиоцитах почечных канальцев экспериментальных крыс означали дозозависимый характер внутриклеточной биodeградации фагоцитарного материала.

Таким образом, гиперплазия вторичных лизосом, фаголизосом и остаточных телец в канальцевых эпителиоцитах при воздействии свинца может свидетельствовать о разворачивании внутриклеточных адаптационных процессов и



о кумуляции свинца в фагоцитарных клетках, которые представляют собой металл-протеиновый комплекс [Аруин Л.И. и др., 1997].

В настоящее время многие актуальные задачи судебно-медицинской экспертизы (в т.ч. диагностики отравлений металлами и их соединениями) могут быть успешно решены за счет расширения комплекса применяемых лабораторных методов исследования. Данные литературы показывают целесообразность, а иногда даже необходимость внедрения методов спектроскопии в экспертную практику с целью определения количественного содержания химических элементов в биологических объектах и вещественных доказательствах иного происхождения [Назаров Г.Н., 1994]. Комбинирование аналитических методов определения металлов в биологических объектах с другими методами (гистологические, иммуногистохимические) позволяет повысить доказательность проводимых экспертиз, дифференцировать различные виды отравлений (острые, хронические), проводить количественную оценку влияния металлов на органы и ткани.

#### **1.14. Оценка воздействия на организм факторов окружающей среды в экспериментальных условиях**

Моделирование на экспериментальных животных патологических состояний и различных заболеваний, характерных или в различной степени воспроизводящих таковые у человека, является мощнейшим оружием ученых, позволяющим изучить патогенетическую структуру и механизмы формирования исследуемых процессов. Важной особенностью методологических подходов к экспериментальному моделированию являются адекватность создаваемой модели патологии человека задачам исследований, допустимость переноса экспериментальных данных с модели на человека в совокупности с информативностью и доступностью критериев и методов оценки патологического процесса в организме лабораторных животных [Соседова Л.М., 2014].

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1 Описание животных

Объектом исследования явились образцы тканей, полученные от экспериментальных животных – крыс линии Wistar (половозрелые самцы и самки, масса 150-200 г). Общее количество животных – 78. Были использованы следующие группы:

1. Опытная группа I (после введения раствора ацетата свинца различной концентрации) – «**свинцовая**» - 36 животных.

2. Опытная группа II (после введения раствора ацетата цинка различной концентрации) – «**цинковая**» - 36 животных.

3. Контрольная группа животных (после введения раствора натрия хлорида) – 6 животных.

#### **Анализ зависимости «доза-эффект» методом формирования подгрупп**

Наиболее распространенный способ определения зависимости «доза-эффект» в группе состоит в формировании в этой группе подгрупп. Животным, входящим в подгруппу, токсикант вводили в одинаковой дозе, а в каждой последующей подгруппе доза увеличивалась. Формирование подгрупп осуществлялось методом случайных выборок [Куценко, С. А., 2002].

До моделирования острого отравления животных содержали в стандартных условиях (СУ) в клетках площадью 750-800 см<sup>2</sup>, предназначенных для 4-6 крыс. Ванночка клетки выполнена из поликарбоната, решетка – из нержавеющей стали, на каждую клетку приходится одна 700 мл бутылка из поликарбоната для питьевой воды. В экспериментальном периоде крыс содержали в индивидуальных клетках (площадью 200 см<sup>2</sup>, предназначенных для содержания 1 крысы). На каждую клетку приходится одна поилка объемом 100 мл, дно клетки представлено решеткой из нержавеющей стали над поддоном с подстилом. Животных содержали в клетках со свободным доступом к воде и корму при

постоянной температуре  $21\pm 1^{\circ}\text{C}$  и регулярном световом цикле 12 ч день/12 ч ночь.

**Соответствие нормам законодательства.** Исследования на животных проводились в соответствии с соблюдением принципов гуманности, изложенных в Директиве Европейского сообщества (2010/63/ЕС). Исследование одобрено локальным этическим комитетом ГБОУ ВПО «КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России (протокол №57/2014 от 10 июня 2014 года).

## 2.2. Дизайн исследования

Экспериментальные группы: однократное внутрибрюшинное введение в виде растворов солей свинца и цинка (соответственно «свинцовая», «цинковая» группы) дозы по 1, 5, 10, 25, 50, 100 мг/кг массы тела в пересчете на металл 6 животным в каждой экспериментальной подгруппе. Через 72 часа после введения – вывод животных из эксперимента, отбор представительных проб – кровь, шерсть, головной мозг, печень, почка, селезенка - для измерения концентрации свинца и цинка в указанных органах и тканях.

Параллельно: Отбор проб: головной мозг, печень, почка, селезенка от 6 животных в экспериментальных группах I, II и в контрольной группе для гистологического, иммуногистохимического исследований.

Контрольная группа: однократное внутрибрюшинное введение 0,9% раствора натрия хлорида 6 животным в группе. Через 72 часа после введения – вывод животных из эксперимента, отбор представительных проб - кровь, шерсть, головной мозг, печень, почка, селезенка - для измерения концентрации свинца и цинка в указанных органах и тканях; головной мозг, печень, почка, селезенка – для гистологического, иммуногистохимического исследований.

Дизайн исследования представлен на рисунке 7.

Формирование экспериментальных и контрольной подгрупп												
Контроль	Введено свинца, мг/кг						Введено цинка, мг/кг					
	1	5	10	25	50	100	1	5	10	25	50	100
												
Эвтаназия крыс												
Отбор представительных проб												
Определение концентрации свинца и цинка						Изучение экспрессии металлотioneина-1			Изучение гистоархитектоники органов			
Кровь, шерсть, головной мозг, печень, почка, селезенка						Головной мозг, печень, почка, селезенка			Печень, почка			
Атомно-абсорбционная спектрометрия свинца		Атомно-абсорбционная спектрометрия цинка				Протокол ИГХ-исследования			Изготовление гистопрепаратов			
									Обзорная микроскопия	Морфометрия		

Рисунок 7 -Дизайн исследования

### **2.3. Описание воздействия на животных. Моделирование острого отравления соединениями свинца и цинка**

Растворы для внутрибрюшинного введения готовили на деионизованной воде, полученной путем двухступенчатой очистки с использованием электрического одноступенчатого аквадистиллятора по ГОСТ 28165, установки для получения деионизованной воды, обеспечивающей получение воды с удельным сопротивлением 15 -18,1 МΩсм<sup>-1</sup>, уксуснокислого свинца по ГОСТ 2017-67, уксуснокислого цинка по ГОСТ 5823-78. Для получения деионизованной воды с удельным сопротивлением не менее 18,1 МΩсм<sup>-1</sup> использовали установку E-pure D4642-33 («Barnstead International»).

Перед моделированием острого отравления соединениями свинца и цинка животное взвешивали на весах (для расчета дозировки металла). Содержание цинка и свинца в стандартных растворах для инъекций - 100 мг/см<sup>3</sup>, при необходимости проводилось кратное разведение.

Растворы различной концентрации (1-100 мг/кг живого веса по металлам) вводили внутрибрюшинно по 0,15-0,25 см<sup>3</sup> растворов различной концентрации в зависимости от массы крыс с помощью шприца однократного применения. Контрольной группе аналогично вводился раствор натрия хлорида 0,9%, приготовленный на деионизованной воде.

### **2.4. Объекты исследования**

Через 72 часа после введения растворов соединений металлов в качестве материала для определения валовой концентрации свинца и цинка отбирали указанные внутренние органы и ткани. Анестезию животным проводили диэтиловым эфиром. Для гистологического и иммуногистохимического исследования отбирались печень, головной мозг, почка, селезенка. Исследовались образцы контрольной группы (без введения в организм токсичного элемента) и экспериментальных групп с внутрибрюшинным введением различных доз (1; 5;

10; 25; 50; 100 мкг на 1 г массы живого веса) свинца или цинка в виде водных растворов их уксуснокислых солей в качестве токсикантов.

**Утилизация биологического материала.** Трупы животных упаковывали и немедленно доставляли в морозильную камеру, предназначенную только для хранения трупов животных. Далее централизованно вывозили для утилизации.

## 2.5. Отбор, хранение и подготовка биологических проб

Отбор проб шерсти производился с различных участков тела белой крысы по всей длине волос. Масса шерсти составляла не менее 0,2 г. Образцы шерсти, порезанные на кусочки длиной 0,2-0,3 см, помещали в пластиковую пробирку вместимостью 15 см<sup>3</sup> с завинчивающейся пробкой, добавляли 5-7 см<sup>3</sup> ацетона для обезжиривания образца, тщательно встряхивали. Через 5-10 мин избыток ацетона удаляли декантацией, обработку повторяли 2-3 раза. Далее образец промывали 5-7 см<sup>3</sup> деионизованной воды дважды. Образец переносили на фильтровальную бумагу и высушивали при комнатной температуре до воздушно сухого состояния. Образцы шерсти хранили в запечатанных полиэтиленовых пакетах.

Отбор проб цельной крови. Объем отобранной цельной крови составлял не менее 1,5 см<sup>3</sup>. Образцы крови при необходимости замораживали при температуре -18<sup>0</sup>С.

Отбор проб биоптатов мягких тканей. Элементарная неидентичность живых организмов и неоднородность распределения элементов в тканях приводит к значительному разбросу результатов анализа. Поэтому в целях получения представительной пробы для анализа отбирали целые органы (одна почка, левая или правая доля печени, селезенка, головной мозг). После препарирования, удаления крови органы взвешивали, помещали в герметичную лабораторную пластиковую посуду, при необходимости замораживали и хранили в морозильной камере при -18<sup>0</sup>С.

## 2.6. Унифицированная методика подготовки проб с различной жировой основой к атомно-абсорбционному измерению

Биологические образцы, как правило, содержат много сложных органических соединений и требуют индивидуальной пробоподготовки для каждой матрицы. Пробы размораживали при комнатной температуре, измельчали, гомогенизировали и тщательно усредняли. Для уменьшения расхождения результатов между параллельными пробами применяли аналитические навески не менее 0,05-0,10 г для шерсти и 0,25 – 0,50 г для крови и внутренних органов. Навески отбирали во фторопластовый вкладыш автоклава, взвешивали, добавляли по 1 мл горячей  $\text{HNO}_3$ , выдерживали 5-10 мин и проводили медленное окисление белков в «мягких» условиях. Далее автоклав собирали и помещали в микроволновую печь. Разложение проб проводили согласно программе нагрева печи (control to pressen): мощность печи – 400 Вт, давление 160 psi, температура – 210°C, время удерживания при максимальной мощности – 5 минут.

После окончания программы автоклавы охлаждали до комнатной температуры, приоткрывали крышку, проводили денитрацию разбавлением проб водой до объема 5 см<sup>3</sup>.

При необходимости проводили дополнительное разбавление анализируемого раствора. При пламенном атомно-абсорбционном спектрометрическом (ПААС) определении элементов концентрация азотной кислоты в анализируемом растворе находилась на уровне 1%, а при электротермическом атомно-абсорбционном спектрометрическом (ЭТААС) определении – 0,1%.

Оптимальные условия микроволнового разложения (навеска, объем кислоты, параметры нагрева автоклавов) обеспечивают полное окисление органической матрицы, в том числе и медленно реагирующие жиры до простых неорганических веществ и перевод цинка, свинца, а также экспериментально доказано, и других элементов в анализируемый раствор. Азотная кислота без добавления других реагентов (пероксида водорода) эффективно окисляет

органическую матрицу, а, удаляя хлорид-ионы из раствора, предотвращает потери легколетучих соединений цинка и свинца и устраняет депрессирующее влияние хлорид-иона на аналитический сигнал определяемых элементов.

Ввиду малого количества исследуемого материала при разработке методики атомно-абсорбционного определения свинца и цинка параметры микроволновой пробоподготовки (мощность, время, давление, температура) были подобраны с учетом возможности работы с одной или двумя параллельными пробами в пределах одного опыта.

Параллельно анализу партии проб проводили три холостых опыта.

## **2.7. Подготовка проб при определении ионных форм свинца и цинка в образцах печени и почки**

В работе предложено применение фосфатной буферной системы для извлечения фосфатозависимых форм свинца и цинка из межклеточной жидкости тканей органов лабораторных крыс при искусственном введении токсиканта в условиях моделирования процесса экзогенной интоксикации организма. Образцы тканей гомогенизировали, обрабатывали фосфатным буферным раствором с pH 7,44 в различных условиях эксперимента. Для определения валового содержания свинца и цинка проводили микроволновое вскрытие (MARS-5) в присутствии азотной кислоты. Для определения элементов использовали атомно-абсорбционные спектрометры: AAnalyst 600 с электротермической атомизацией для определения свинца (длина волны 283,3 нм; графитовая печь «endcups»; Зеемановская коррекция неселективного поглощения) и SolaarM6 с пламенной атомизацией для определения цинка (длина волны 213,9 нм; дейтериевая коррекция неселективного поглощения).

Установлено, что фосфатная буферная система вносит существенный вклад в фоновый сигнал при электротермическом атомно-абсорбционном определении свинца. Так, для почек и печени значение фона увеличивается в 30-50 раз соответственно, что затрудняет определение свинца на уровне низких содержаний



менее 2 мкг/г. Предложена более длительная и «жесткая» восьмистадийная температурно-временная программа нагрева печи. При этом время анализа одной пробы увеличилось со 110 до 120 с, что позволило более эффективно проводить процесс атомизации свинца в присутствии фосфатной буферной системы, снизить фоновый сигнал и устранить эффект накопления фосфатов в графитовой печи. Атомизацию свинца проводили при температуре 1700<sup>0</sup>С без модифицирования матрицы.

Для проведения экстракции ионных форм свинца и цинка гомогенизированную навеску образца (ткань почки или печени) массой 0,15-0,25 г помещали в градуированную пластиковую пробирку вместимостью 15 мл, добавляли 4 мл фосфатного буферного раствора, закрывали крышкой и встряхивали в течение 1 час при комнатной температуре. Далее проводили центрифугирование при 3000 об./мин. в течение 10 минут. При помощи микродозатора отбирали надосадочную жидкость, помещали в пластиковую градуированную пробирку, вместимостью 15 мл, добавляли 5 мкл конц. азотной кислоты и перемешивали. При определении ионных форм свинца и цинка дополнительное разведение не требовалось.

При подготовке проб к анализу в обоих случаях параллельно партии проб проводили три холостых опыта.

## **2.8. Оборудование для пробоподготовки и определения концентрации свинца и цинка**

Разложение проб биосубстратов проводили с применением системы микроволнового разложения MARS-5 («CEM CORPORATION», USA) с набором автоклавов XP-500 во фторопластовых вкладышах в концентрированной азотной кислоте по ГОСТ 11125, марки «ос.ч», дополнительно очищенной методом некипящей перегонки в пластиковой системе для перегонки кислот distillacid<sup>TM</sup>BSB-939-IR «BERGHOF».

Концентрацию свинца и цинка в растворах после вскрытия биологических образцов определяли атомно-абсорбционным методом на спектрометрах Solaar M6 (Thermo Electron Corporation, США) с пламенным (ацетилен-воздух) и AAnalyst 600 (Perkin-Elmer, США) с электротермическим атомизатором. Содержание цинка также определяли атомно-эмиссионным методом с индуктивно связанной плазмой ( $\lambda=206,200$  нм, радиальный обзор плазмы) на спектрометре iCAP 6500 (Thermo Electron Corp. США) (Таблица 7).

Навеску образца для разложения взвешивали на аналитических электронных весах с пределом допускаемой погрешности  $\pm 0,00001$  г («Mettler Toledo XP 205», Швеция), отвечающих требованиям «Весы лабораторные общего назначения» по ГОСТ 24104.

Дозирование жидкостей проводили микропипетками переменного объема, обеспечивающими суммарную погрешность дозирования на уровне  $\pm 1\%$ , емкостью 0,5-10 мкл, 20-200 мкл, 100-1000 мкл с пластиковыми наконечниками (PLASTOMED), и полипропиленовые градуированные пробирки (2 и 15 мл).

Таблица 7 – Оптимальные аппаратурные параметры спектрометров при определении свинца и цинка

Элемент Параметры	Свинец (Pb)			Цинк (Zn)
Модель	AAnalyst 600		SolaarM6	
Техника атомизации	Электротермическая		Пламенная	
Атомизатор	Графитовая печь «EndCaps» поперечного нагрева (THGA) с интегрированной платформой Львова (STPF)	Графитовая печь «LongLife» продольного нагрева (GF-95)	Ацетилен (0,9 л/мин) - воздух. Высота горелки 5,8 мм	Ацетилен (0,8 л/мин) - воздух. Высота горелки 7 мм
Источник излучения (кодированный)	Высокочастотная безэлектродная лампа	Лампа с полым катодом		
Ток лампы, мА	440	10	10	5
Длина волны, нм	283,3			213,9
Ширина щели монохроматора,	0,7	0,5	0,2	0,2

нм				
Коррекция фона	Zeeman		Quadline (усиленная дейтериевая)	
Абсорбционный сигнал	Площадь пика		Высота пика	
Время измерения сигнала, с	4,0			
Предел обнаружения (3s – критерий)	0,1 мкг/л	1 мкг/л	0,05 мкг/мл	0,005 мкг/мл

## 2.9. Реактивы и вспомогательные материалы

**Вспомогательные материалы:** ацетон, «ос.ч.» по ТУ 2633-039-44493179-00; скальпель хирургический; фильтровальная бумага; одноразовые полипропиленовые градуированные пробирки с винтовыми крышками, вместимостью 2,0 и 15 см<sup>3</sup>, шприцы инъекционные одноразовые стерильные с иглой (рег. Удостоверение МЗ РФ № 2003/1634 от 22.12.2003 г.).

**Реактивы.** Аргон газообразный «высший сорт» по ГОСТ 10157-79, ацетилен растворенный и газообразный технический в баллонах по ГОСТ 2457.

Азотная кислота по ГОСТ 11125 квалификации «ос.ч.(27-5)», дополнительно очищенная с использованием установки distillacid<sup>TM</sup>BSB-939-IR «BERGHOF». Рабочие растворы азотной кислоты меньшей концентрации готовили разбавлением очищенной кислоты деионизованной водой.

Для приготовления фосфатной буферной системы с pH 7,44 готовили два раствора: Раствор А: 1/15 М КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub>: навеску сухого КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub> 0,4582 г помещали в пластиковую пробирку (объемом 50 см<sup>3</sup>), доводили до объема 50 см<sup>3</sup> деионизованной водой и перемешивали. Раствор Б: 1/15 М Na<sub>2</sub>НРО<sub>4</sub>\*12 Н<sub>2</sub>О: навеску Na<sub>2</sub>НРО<sub>4</sub>\*12 Н<sub>2</sub>О 1,1943 г помещали в пластиковую пробирку (50см<sup>3</sup>), доводили до объема 50 см<sup>3</sup> деионизованной водой и перемешивали. Затем готовили смесь: к 40,4 см<sup>3</sup> раствора Б добавляли 9,6 мл раствора А и перемешивали.

В качестве модификатора при электротермическом атомно-абсорбционном определении свинца использовали нитрат палладия (II) с концентрацией 10 г/л в

15%-ной азотной кислоте (Perkin Elmer, США). Модификатор вводили в растворы при построении градуировочных графиков и анализируемые растворы непосредственно перед измерением концентрации свинца.

## 2.10. Построение градуировочных графиков

Использовались государственные стандартные образцы (ГСО) - водные растворы состава ионов цинка и свинца с концентрацией 1,00 мг/мл соответственно ГСО № 7256 и ГСО № 7778.

Для построения градуировочных графиков использовали стандартные растворы, приготовленные в день измерений из ГСО состава раствора ионов свинца и цинка (Таблица 8).

Объём калибровочного раствора соответствовал общему объёму анализируемого образца на цинк и свинец в пламени в 1%  $\text{HNO}_3$  и при электротермическом определении свинца в графитовой печи в 0,1%  $\text{HNO}_3$ . Градуировочные растворы готовили весовым методом, с учетом применяемого фактора разбавления.

Для оценки чувствительности градуировку спектрометров выполняли перед началом измерений проб, используя стандартные градуировочные растворы свинца и цинка при параметрах, указанных в таблице 7.

Градуировочные графики линейны в указанных диапазонах концентраций (коэффициенты корреляции при определении свинца – 0,9999, цинка - 0,9991).

Таблица 8 - Рабочие стандартные растворы свинца и цинка

Метод	Концентрация стандартных растворов	Элементы	Единицы измерения	Концентрация рабочих растворов (одноэлементных)				
				5	10	20	30	40
ЭТААС	1 мкг/мл	Pb (1) модификатор (2 мкл/1мл)	мкг/л	5	10	20	30	40
ПААС	10 мкг/мл	Pb (2)	мкг/мл	0,2	0,4	0,8	1,6	4,0
	10 мкг/мл	Zn (3)	мкг/мл	0,1	0,2	0,5	1,0	-

## 2.11. Выполнение измерений

Техника атомно-абсорбционного анализа, реализуя гибкость метода, позволяет проводить универсальными приемами с высокой производительностью, правильностью и воспроизводимостью массовое определение широкого круга элементов в большом диапазоне концентраций:

- в пламени – от десятитысячных долей процента до десятков массовых процентов;

- в электротермических атомизаторах нижняя граница определяемых массовых долей для многих элементов составляет  $10^{-9}$ - $10^{-4}$  % масс., верхняя – до диапазона пламенных определений.

В практике наиболее распространен пламенный вариант метода атомно-абсорбционного анализа, использующий простую, дешевую аппаратуру и обеспечивающий быстрые (экспозиция 0,1 с) и высокоточные измерения. В нашем случае исследуемые образцы имеют большой динамический концентрационный диапазон по цинку, что позволило подобрать оптимальный фактор разбавления для различных матриц и проводить прямое атомно-абсорбционное определение после СВЧ-минерализации. Аппаратурный предел обнаружения (по 3S-критерию) цинка достаточно низкий (0,001 мкг/мл) и лимитирован в основном чистотой контрольного холостого опыта. Все это позволило использовать в качестве атомизатора пламя ацетилен-воздух (расход ацетилена 0,8 л/мин, высота горелки 7 мм), при этом значительные матричные влияния на сигнал атомного поглощения нивелированы с использованием типа коррекции фона Qudline.

Большая часть указанных недостатков при атомизации в пламени отсутствует в электротермических атомизаторах, позволяющих снизить пределы обнаружения большинства элементов на два-три порядка, нивелируя при этом значительные матричные влияния с использованием эффекта Зеемана.

Поскольку свинец и цинк относят к легколетучим элементам, а биологические образцы относят к объектам со сложной матрицей, оказывающей

значительное влияние на процессы формирования аналитического сигнала, на стенку графитовой печи или в анализируемые растворы вводили палладиевый модификатор, что позволило увеличить температуру на стадии озоления. В программу введена постадийная сушка пробы.

Для подготовки исследуемых образцов к электротермическому атомно-абсорбционному определению свинца к аликвоте исследуемого раствора добавляли химический модификатор - нитрат палладия (II) из расчета - 2 мкл модификатора на 1 см<sup>3</sup> исследуемого раствора. Для реализации различных режимов нагрева графитовых печей анализ растворов проводили на спектрометрах AAnalyst-600 и SolaarM6.

Градуировку спектрометра выполняли перед началом измерений подготовленных проб, используя градуировочные растворы свинца и цинка.

При электротермическом атомно-абсорбционном определении свинца использовали температурно-временную программу нагрева графитовой печи (ТВП), приведенную в таблице 9.

Таблица 9 - Температурно-временная программа для электротермического атомно-абсорбционного определения свинца (объем дозируемого раствора 20 мкл)

Стадия ТВП	Температура, °С	Время нагрева, с	Время выдержки, с	Поток аргона, мл/мин
Сушка 1	100	15	30	250
Сушка 2	130	15	20	250
Пиролиз	900	5	20	250
Атомизация	2100	0	4	0
Очистка	2450	1	3	250

Примечание: температура ввода пробы 25±2<sup>0</sup>С.

## 2.12. Обработка результатов анализа, расчет содержания элементов в образцах

Аналитические сигналы (Рисунок 8) обрабатывали при помощи программного обеспечения прибора, используя градуировочные зависимости, рассчитываемые методом наименьших квадратов, учет и коррекцию фона. Содержание цинка или свинца в мкг/г рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{C_1 V_1 - C_2 V_2}{m_0}$$

где,  $C_1$  – содержание элемента в пробе, найденное по градуировочному графику, мкг/мл;

$V_1$  – объем анализируемого раствора пробы после минерализации, мл;

$m_0$  – масса навески, г;

$C_2$  – содержание элемента в холостой пробе, найденное по градуировочному графику, мкг/мл;

$V_2$  – объем раствора холостой пробы, мл.

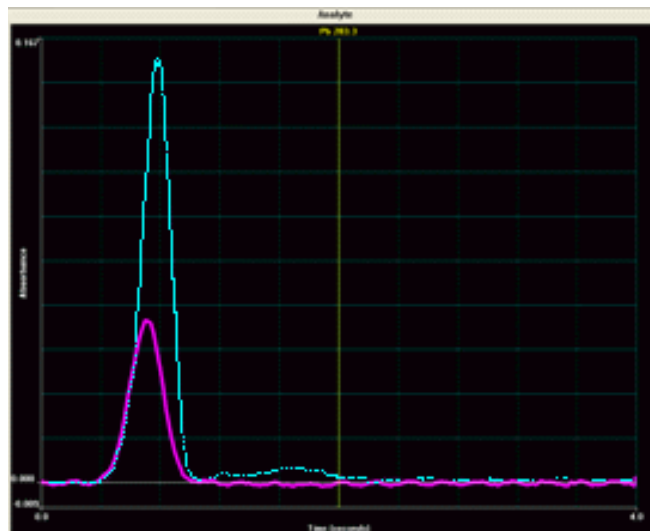


Рисунок 8 - Сигнал атомного поглощения при электротермическом зеемановском определении свинца в графитовой печи поперечного нагрева (AAnalyst 600) (почка). Кривая зеленого цвета – почка, кривая фиолетового цвета – стандартный раствор

### 2.13. Иммуногистохимическое исследование

Изъятые органы экспериментальных животных помещались в забуференный 10% формалин (4,0 г натрия дигидрофосфата и 6,5 г натрия гидрофосфата в 1 литре формалина), с дальнейшим изготовлением парафиновых блоков. Приготовление парафиновых блоков проводили по стандартной методике [Коржевский Д.Э., 2010]. Срезы толщиной 4 мкм изготавливали на микротоме Thermo Scientific Microm HM 325 Rotary Microtome. После этого срезы аккуратно с помощью кисточек фиксировали на стеклах с полилизинным покрытием (Polysine Slides, Thermo Scientific), удаляли излишек воды с помощью фильтровальной бумаги. Иммуногистохимическое выявление антигена в парафиновых срезах иммунопероксидазным методом проводили по методике компании – производителя антител: помещали планшеты со стеклами в термостат при 45°C на 60 минут. Депарафинизацию срезов осуществляли в вытяжном шкафу путем последовательного помещения их в 3 смены ксилола, по 5 минут каждая. После третьей смены ксилола стекла помещали в 3 смены абсолютного этанола, по 3 минут каждая. Далее следовали две 3-х минутных смены 95% этанола и одна 3-х минутная смена 80% этанола и промывка водой очищенной. Для обзорной оценки препаратов осуществляли окраску гематоксилином и эозином по стандартной методике [Коржевский Д.Э., 2010].

Применяли первичные антитела к металлотioneину – моноклональные (Metallothionein Mouse anti-Rabbit Monoclonal (UC1MT) Antibody - LS-B3698 – LSBio) в разведении 1:100. Для детекции первичных антител использованы вторичные поликлональные антитела (Mouse IgG Horse anti-Mouse Polyclonal (Biotin) Antibody - LS-D2 – LSBio) в разведении 1:100. Производитель – Life Span BioSciences, Inc. Набор реагентов для визуализации - на основе полимера Novolink и пероксидазы (RE 7290-K). Для фонового докраски использовали гематоксилин.

По окончании депарафинизации осуществляли предобработку срезов. Срезы нагревались в 0,01 М растворе цитратного буфера (pH=6.0) при 100°C,



экспонировались в буфере при комнатной температуре 20 минут, промывались 1 сменой TBST.

Для устранения неспецифического окрашивания наносили универсальную блокирующую сыворотку, инкубировали срез при комнатной температуре 20 минут, сыворотка удалялась, наносили первичные антитела в оптимальном разведении, описанном выше, на 45 минут, промывали срезы в TBST. Вторичные антитела наносились в разведении, указанном выше, срезы инкубировались 30 минут при комнатной температуре, промывались 1 сменой TBST, добавлялся щелочной фосфатазы стрептавидин, экспозиция 30 минут, промывка 1 сменой TBST, наносилась метка (alkaline phosphatase chromogen substrate) на 30 минут, срезы промывались водой.

Накрывали срез покровным стеклом и микроскопировали на световом микроскопе Olympus CX41 при использовании соответствующего светофильтра. Оценивание снимков производилось с помощью пакета ImageJ.

Для оценки степени экспрессии МТ использовали полуколичественный метод, разделяя по интенсивности окрашивания и площади экспрессии: 0 – нет окрашивания (отсутствие экспрессии); + (1 балл) - слабое окрашивание, < 5% клеток; ++ (2 балла) - окрашивание < 5-25% клеток; +++ (3 балла) - окрашивание < 26-50% клеток; ++++ (4 балла) - окрашивание > 50% клеток (гиперэкспрессия).

Ставили позитивные и негативные контрольные реакции. Позитивным контролем для иммуногистохимического исследования послужили реакции на неизмененных тканях с известной положительной реакцией, негативный контроль – без первичных антител.

## 2.14. Гистологическое исследование

Можно предположить, что если следы воздействия токсикантов прогрессируют, давая начало развитию выраженного патологического процесса, то их следовало бы искать прежде всего в тех тканях организма, которые медленно обновляют свой клеточный состав. После воздействия больших

(сублетальных) доз именно такие ткани оказываются критическим звеном в развитии осложнений. Именно в них наблюдается большинство необратимых изменений, приводящих к серьезным нарушениям в деятельности различных систем организма [Кирик, О.В., 2004].

При проведении гистологического исследования производили сопоставление морфофункциональных особенностей изучаемых органов с их нормальной структурой. Учитывая наиболее значительные изменения концентрации цинка и свинца во внутренних органах крыс, гистологическому исследованию подвергали печень, почку, поскольку патологические изменения в этих органах являются наиболее значимыми для идентификации острого отравления.

Отобранные органы помещались в 10% формалин, фиксировали в течение 5 дней, затем промывали проточной водой в течение 30 минут. Для обезвоживания объекты проводили в 3 последовательных сменах безводного этилового спирта в течение 30 минут каждая, помещали в смесь безводный этиловый спирт : ксилол (1:1) на 30 минут, проводили через 3 смены ксилола по 5 минут каждая. После этого куски помещали в смесь ксилол:парафин (1:1) и инкубировали в термостате при температуре 57°C в течение 1 часа, затем последовательно проводили через 3 смены жидкого парафина по 1 часу каждая при температуре 57°C. После чего пропитанные парафином фрагменты органов заливали в парафиновые блоки и с помощью микротомы Thermo Scientific Microm HM 325 Rotary Microtome изготавливали срезы толщиной 5 мкм. После этого срезы расправляли на водяной бане и фиксировали на предметных стеклах (BioVitrum Ltd).

Окраску срезов проводили по стандартизированной методике: депарафинизация срезов в 2-х сменах ксилола по 5 минут и в 2-х сменах 96% этилового спирта по 5 минут; промывание водой и осушение, затем срезы помещали в гематоксилин Майера на 20 минут, отмывали горячей водой, докрашивали 0,5% раствором эозина 2 минуты, отмывали в трех сменах 96% этилового спирта по 10 минут, смеси карбол:ксилол (1:1) – 5 минут и двух сменах ксилола по 5 минут. Приготовленные таким образом препараты заливали

монтирующей средой BioMount 05-ВМ 500 («BioOptica»), накрывали покровными стеклами.

Морфологическое исследование проводилось на микроскопе Olympus BX45 с насадкой для фото-видеодокументации Olympus DP 25 и пакетом программного обеспечения Cell<sup>^</sup>D. Морфометрию осуществляли с помощью пакетов прикладных программ для морфометрии Cell<sup>^</sup>D и JMicroVision 1.2.7

Препараты, окрашенные гематоксилин-эозином, подвергали обзорной микроскопии для оценки общей гистоархитектоники органов, а также проводили морфометрию.

В препаратах почек измеряли наружный и внутренний диаметры проксимальных канальцев в корковом веществе; площадь почечных телец, капиллярных петель сосудистых клубочков (покрытых внутренним листком капсулы клубочка) и вычисляли площадь полости капсулы (мочевое пространство): (площадь почечного тельца) – (площадь сосудистого клубочка)=(мочевое пространство).

Кроме того, в препаратах почки измеряли высоту эпителия, т.е.  $1/2$  разности между наружным и внутренним диаметрами проксимальных канальцев в корковом веществе.

В препаратах печени измеряли площадь гепатоцитов и их ядер, рассчитывали ядерно-цитоплазматическое отношение (ЯЦО):

$$\text{ЯЦО} = \frac{S_{\text{ядра}}}{S_{\text{гепатоцита}}}$$

Полученные морфометрические данные заносили в протокол исследования и подвергали статистической обработке.

## 2.15. Валидационная оценка аналитических методик

Важнейшим критерием оценки аналитической методики служит доказательство ее валидности, включающей взаимосвязанную систему

характеристик – специфичность, линейность, прецизионность (воспроизводимость) и точность.

**Специфичность** (specificity) — способность однозначно оценивать анализируемое вещество в присутствии других компонентов, которые могут присутствовать в образце.

**Линейность** (linearity) — это способность методики (в пределах диапазона применения) получать результаты испытаний, прямо пропорциональные концентрации анализируемого вещества в образце. Линейность методики определяли по результатам измерения не менее 5 разных разведений исследуемого раствора в диапазоне применения как минимум 80-120 % концентрации анализируемого вещества в исследуемом растворе. Для оценки степени линейности рассчитывали коэффициент корреляции, который должен быть не меньше 0,995.

Стандартные раствора цинка и свинца готовились из растворов путем разбавления их деионизованной водой до требуемой концентрации. Градуировочные прямые для цинка и свинца были линейными при концентрациях элементов от 1 до 100 мкг/мл.

**Прецизионность** (precision) аналитической методики выражает степень близости (или степень разброса) результатов для серии измерений, выполненных по данной методике на различных пробах одного и того же однородного образца. Прецизионность может рассматриваться на трех уровнях: сходимости, внутрилабораторная прецизионность и воспроизводимость.

В качестве значения прецизионности метода применялось относительное стандартное отклонение (RSD). Для цинка RSD – 1%, для свинца RSD - 5%.

**Воспроизводимость** характеризует степень совпадения результатов индивидуальных испытаний при многократном его использовании. Воспроизводимость характеризует надежность анализа в выбранных параметрах метода. Предел воспроизводимости, согласно требованиям нормативной документации, находился в пределах 5%.

**Правильность или точность** (accuracy, trueness) характеризует степень соответствия между известным истинным значением и значением, полученным по методике.

**Точность метода** оценивалась в сравнении с исследованием референтного материала, содержащего сертифицированные значения цинка и свинца (ГСО).

Влияние интерференции различных металлов (железа и др.) устранялось измерением абсорбции на определенных длинах волн. Для цинка длина волны – 213,9 нм, для свинца длина волны - 283,3 нм.

Точность аналитической методики количественного определения подтверждалась на всем диапазоне применения. Оценка проводилась путем сравнения полученного результата с ожидаемым значением.

### **Предел детектирования и количественного определения**

Для проб предел детектирования (LOD) составил 3 единицы стандартного отклонения, предел количественного определения (LOQ) – 10 единиц стандартного отклонения:

$$LOD = \frac{3\delta_{sp.}}{a},$$

$$LOQ = \frac{10\delta_{sp.}}{a}$$

где  $3\delta_{sp.}$  и  $10\delta_{sp.}$  – 3-х и 10-кратное среднее квадратичное отклонение (СКО) в стандартных пробах;

$a$  – среднее арифметическое значение концентрации.

## **2.16. Методы статистической обработки результатов исследований**

Статистическая обработка данных осуществлялась с применением пакета программ IBM SPSS 19.0. Проверка гипотезы о нормальности распределения количественных признаков проводилась с помощью критерия Шапиро–Уилкса.

Описательные статистики для количественных признаков с нормальным распределением представлены средними значениями и стандартными отклонениями или 95% доверительным интервалом ( $\bar{X} \pm S$ ,  $\bar{X} \pm \Delta x$ ). Характеристика вариационных рядов для количественных признаков с непараметрическим распределением представлена медианой (Me) и перцентилями [Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>]. Сравнение показателей в двух выборках при нормальном распределении признака проводилось с помощью критерия Стьюдента. Для сравнения независимых рядов данных, не подчиняющихся нормальному распределению, применялся U-критерий Манна-Уитни. Взаимосвязи между признаками рассчитывались по коэффициенту корреляции Пирсона. Далее для определения различий в эффективности методик проводилось сравнение полученных переменных, как независимых рядов данных. Статистическая значимость принималась при  $p \leq 0,05$ .

Воспроизводимость анализа оценивалась по относительному стандартному отклонению  $S_r$  - отношению стандартного отклонения к среднему значению:

$$S_r = \frac{S}{\bar{X}}$$

## **ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

### **3.1. Определение концентрации свинца и цинка методом атомно-абсорбционной спектрометрии**

Полезным сигналом в атомно-абсорбционной спектрофотометрии (ААС) является величина поглощения энергии света спектральной лампы при атомизации соответствующего ей химического элемента в ацетиленовом пламени или графитовой кювете [Столярова И.А., 1981].

Прибор калибруется по серии эталонных растворов, которые готовятся кратным разбавлением жидких государственных стандартных образцов (ГСО) или составляются из приготовленных растворов соответствующих неорганических солей по традиционным методикам. Результатом калибровки является построение линейной регрессии, представляющей собой зависимость величины поглощения энергии луча спектральной лампы соответствующего элемента от его концентрации в исследуемом растворе [МИ 2336-2002].

#### **3.1.1. Результаты подбора условий для исследования**

Биологические образцы имеют большой динамический концентрационный диапазон по определяемым металлам, что позволило подобрать оптимальный фактор разбавления для различных матриц.

Предварительными экспериментами установлено, что валовое содержание цинка в растворах после микроволнового вскрытия контрольных проб находится на уровне 0,1-10 мкг/мл, а свинца – от 0,0001 до 0,003 мкг/мл при навеске 0,25 г и объеме анализируемого раствора 5 мл, что позволяет использовать для определения цинка атомно-абсорбционную спектрометрию с пламенной, а для определения свинца - с электротермической атомизацией [Морозова А.П. и др., 2010]. В пламени ацетилен-воздух соединения цинка полностью диссоциируют, при этом влияние состава раствора на его определение незначительно [Брицке

М.Э., 1982], а при использовании окислительного пламени отсутствует полностью [Хавезов И., 1983], что позволило использовать в качестве калибровочных растворов безматричные растворы, приготовленные на основе 1%-ной азотной кислоты [Брицке М.Э., 1982]. В условиях окислительного режима горения пламени незначительные матричные влияния, вызванные высоким солевым фоном (Са, Р до 1000 мкг/мл, Na, К, Mg до 500 мкг/мл) зависят от равновесных и температурных условий пламени и полностью нивелируются коррекцией фона.

При определении цинка по линии 213,9 нм (213,856 нм) возможны спектральные помехи со стороны малоинтенсивной спектральной линии железа 213,859 нм за счет перекрывания ею спектральной линии цинка. Известно [Скальный А.В., 2004], что 2/3 от общего содержания железа в организме человека и животных находится в крови и 1/3 - в печени и селезенке. Влияние железа учтено в работе и установлено, что присутствие железа в растворе до 2 мг/мл не влияет на результаты определения цинка.

В воздушно-ацетиленовом пламени определение свинца на резонансной линии 283,3 нм практически свободно от помех при зондировании аналитической зоны на уровне граничной реакционной зоны пламени.

При определении концентрации свинца в анализируемом растворе менее 500 мкг/л использовали ЭТААС с поперечным нагревом графитовой печи со встроенной платформой Львова (Analyst 600), обеспечивающей наиболее благоприятные условия атомизации элементов и позволяющей получить максимальную точность определения, что особенно важно при анализе биологических объектов [Пупышев А.А., 2009]. При ЭТААС определении свинца использовали пятиступенчатую температурно-временную программу (ТВП) нагрева графитовой печи, разработанную на основе экспериментальных кривых пиролиза и атомизации. Свинец и его химические соединения, образующиеся в аналитической зоне атомизатора, являются легколетучими. Введение палладиевого модификатора позволило максимально увеличить температуру на стадии пиролиза с 600<sup>0</sup>С до 900<sup>0</sup>С без потерь свинца и получить аналитический сигнал правильной гауссовой формы, свободный от двойных пиков различных



форм окислов свинца, различающихся кинетикой процессов испарения и диссоциации [Пупышев А.А., 2009].

### 3.1.2. Результаты определения валового содержания свинца и цинка в объектах исследования

Результаты определения свинца в биологических образцах контрольной и экспериментальной групп крыс приведены в Таблице 10, а результаты определения цинка - в Таблице 11.

Таблица 10 - Результаты атомно-абсорбционного определения свинца в биологических образцах без и с введением различных доз свинца (n=6)

Образец	Содержание Pb, мкг/г ( $\bar{X} \pm S$ )						
	Контрольная группа	Экспериментальная группа					
		Введено Pb, мкг на 1 г живого веса					
	0	1	5	10	25	50	100
Головной мозг	0,007±	0,014±	0,18±	0,21±	0,44±	0,61±	0,78±
	0,003	0,005	0,05	0,04	0,06	0,08	0,19
Кровь	<0.001	0,06±	0,16±	0,71±	0,9±	1,3±	3,4±0.4
		0,02	0,06	0,15	0,14	0,15	
Почка	0,013±	1,3±0,4	15±3	21,1±7	26,0±5	31,1±5	48,2±8
	0,003	$p_1 < 0,001$	$p_2 < 0,001$	$p_3 < 0,001$	$p_4 < 0,001$	$p_5 < 0,001$	$p_6 < 0,001$
Печень	0,009±	0,61±	4,9±1,4	108,1±19	113,2±17	121,1±17	130±23
	0,001	0,15	$p_2 < 0,001$	$p_3 < 0,001$	$p_4 < 0,001$	$p_5 < 0,001$	$p_6 < 0,001$
Селезенка	0,009±	0,19±	7,6±0,9	90±13	114,2±14	476,4±37	921,5±
	0,002	0,07	$p_2 < 0,001$	$p_3 < 0,001$	$p_4 < 0,001$	$p_5 < 0,001$	100
Шерсть	0,011±	0,052±	0,12±	0,91±	1,0±	4,6±	20,0±4
	0,005	0,006	0,03	0,18	0,19	0,29	$p_6 < 0,001$

$p_n$  – достоверность различий экспериментальных данных по отношению к контрольной группе; t-критерий Стьюдента.

Таблица 11 - Результаты пламенного атомно-абсорбционного определения цинка в биологических образцах без и с введением различных доз цинка (n=6)

Образец	Содержание Zn, мкг/г ( $\bar{X} \pm S$ )						
	Контрольная группа	Экспериментальная группа					
		Введено Zn, мкг на 1 г живого веса					
	0	1	5	10	25	50	100
Головной мозг	14,1±1,1	13,8±0,4 $p_1=0,8$	14,0±0,5 $p_2=0,9$	14,6±0,7 $p_3=0,8$	12,9±0,9 $p_4=0,5$	14,4±0,47 $p_5=0,8$	16,3±1,0 $p_6=0,1$
Кровь	3,9±0,5	3,2±0,6 $p_1=0,4$	3,1±0,4 $p_2=0,3$	3,2±0,52 $p_3=0,4$	3,2±0,77 $p_4=0,5$	3,9±0,3 $p_5=1$	6,1±0,7 $p_6=0,05$
Почка	23,5±2	24,1±4 $p_1=0,9$	23,0±2 $p_2=0,9$	27,1±5 $p_3=0,6$	32,3±6,6 $p_4=0,2$	40,9±7,3 $p_5=0,05$	50,1±5 $p_6<0,001$
Печень	25,7±4	33±3 $p_1=0,2$	38,1±5 $p_2=0,1$	44,3±3 $p_3=0,005$	91,4±13,8 $p_4=0,002$	106,8±5,4 $p_5<0,001$	116±9 $p_6<0,001$
Селезенка	22,7±3	26,2±3 $p_1=0,5$	23,2±2 $p_2=0,9$	25,1±5 $p_3=0,7$	25,4±3,9 $p_4=0,6$	27,8±4,1 $p_5=0,3$	34±5 $p_6=0,05$
Шерсть	198,2±24	228±17 $p_1=0,3$	226,1±22 $p_2=0,5$	234±6 $p_3=0,2$	232±9,2 $p_4=0,3$	227±15,7 $p_5=0,4$	226±11 $p_6=0,4$

$p_n$  – достоверность различий экспериментальных данных по отношению к контрольной группе; t-критерий Стьюдента.

Низкие аппаратные пределы обнаружения свинца и цинка лимитированы в основном чистотой контрольного опыта, особенно по цинку. Ввиду того, что цинк относится к весьма распространенным в окружающей среде элементам, можно предположить, что основную составляющую в погрешность анализа вносит факт неравномерного распределения элемента в биологических пробах и погрешность, обусловленная чистотой препарирования и отбора проб.

На следующем этапе эксперимента проведена проверка воспроизводимости методики определения концентрации свинца и цинка.

### 3.1.3. Результаты проверки правильности и воспроизводимости методики определения свинца и цинка

Ввиду отсутствия стандартных образцов состава исследуемых биологических объектов, для проверки правильности методик определения валового содержания свинца использовали метод добавок (Таблица 12) при этом добавки вводили в анализируемые образцы контрольной группы и проводили через все стадии аналитического цикла, способом варьирования (удвоения) массы навески образца (Таблица 13) и сравнением результатов с результатами, полученными методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой (Таблица 14).

Таблица 12 - Результаты проверки правильности методики атомно-абсорбционного определения валового содержания свинца методом добавок (экспериментальная группа 5 мг/кг свинца) ( $P=0,95$ ,  $n=6$ )

№	Образец	Введено , мкг/г	Найдено без добавки, мкг/г ( $\bar{X} \pm \Delta x$ )	Найдено с добавкой, мкг/г ( $\bar{X} \pm \Delta x$ )	Найдено добавки, мкг/г ( $\bar{X} \pm \Delta x$ )	$S_r$
1	Кровь (контрольная группа)	0,051	<0,001	0,052±0,014	0,051± 0,003	0,11
2	Селезенка (эксперименталь ная группа, введено 5 мкг на 1 г живого веса)	15,6	7,6±0,5	23,1±0,9	15,5± 0,09	0,07

Таблица 13 - Проверка правильности методики атомно-абсорбционного определения валового содержания свинца и цинка в крови (экспериментальная группа, 10 мг/кг свинца) способом варьирования (удвоения) навески ( $P=0,95$ ,  $n=6$ )

Навеска, г	Найдено, мкг/г ( $\bar{X} \pm \Delta x$ )	
	Свинец	Цинк
0,25	0,67 ± 0,16	3,3 ± 0,2
0,5	0,72 ± 0,16	3,2 ± 0,2

Таблица 14 - Результаты определения цинка в биологических образцах контрольной группы крыс методами атомной абсорбции (ААС) и атомной эмиссии с индуктивно связанной плазмой (АЭС-ИСП) ( $P=0,95$ ,  $n=6$ )

Образец	Найдено цинка, мкг/г ( $\bar{X} \pm \Delta x$ )	
	ААС	АЭС-ИСП
головной мозг	17,6±3,1	19,5±3,4
почка	25,8±4,5	28,7±5,0
печень	30,6±5,3	34,9±6,1
селезенка	21,9±3,8	24,5±4,3

Как видно из приведенных в таблицах 12-14 результатов, методики определения свинца и цинка характеризуются достаточно высокой правильностью и воспроизводимостью. Данные по определению цинка АЭС-ИСП немного завышены по сравнению с результатами, полученными ААС, однако, сравнение их по t-критерию Стьюдента свидетельствует, что эти данные принадлежат к одной выборочной совокупности.

Разработанные методики позволяют определять валовое содержание свинца в диапазоне от 0,005 до 2500 мкг/г и цинка - от 1 до 300 мкг/г.

## 3.2. Результаты исследования динамики распределения цинка и свинца в различных органах и тканях крыс

### 3.2.1. Распределение цинка

Результаты определения концентрации цинка в различных органах и периферической крови представлены на рисунках 9-14 и в таблице 11. Экспериментальные данные позволили установить неравномерное распределение цинка в различных органах и тканях лабораторных животных. Так, при разных вводимых дозах раствора цинка в крови не обнаружено значимых изменений его концентрации в интервале от 1 до 50 мг/кг массы тела животных по отношению к контрольной группе ( $p=1$ ). Лишь при концентрации вводимого раствора 100 мг/кг массы тела наблюдается значимое изменение концентрации цинка в крови (56,4%,  $p=0,05$ ) – до 6,1 мг/кг – (Рисунок 9).

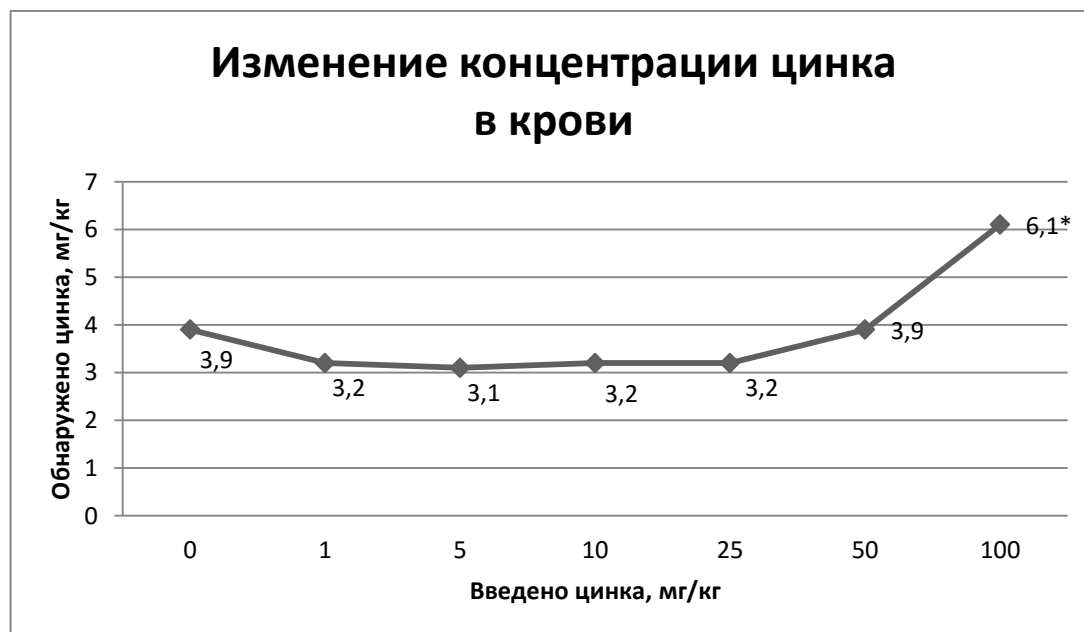


Рисунок 9 – Изменение концентрации цинка в крови при различных вводимых дозах ( $n=6$ ), 0 – контрольная группа

\* -  $p_n \leq 0,05$  по отношению к контрольной группе;

Гораздо существеннее меняется концентрация цинка в печени. Концентрация цинка значимо изменяется уже при вводимой концентрации 10 мг/кг (увеличение на 72,4%,  $p=0,005$ ), далее возрастает и достигает

максимума при вводимой концентрации 100 мг/кг массы тела животных до 116,0 мг/кг (рост в 3,5 раза,  $p < 0,001$ ). Отмечается линейность возрастания значений концентрации цинка в диапазонах вводимых концентраций от 1 до 10 мг/кг и от 25 до 100 мг/кг массы тела крыс и резкий рост концентрации в диапазоне от 10 до 25 мг/кг (Рисунок 10).



Рисунок 10 – Изменение концентрации цинка в печени при различных вводимых дозах ( $n=6$ ), 0 – контрольная группа

\* -  $p_n \leq 0,05$  по отношению к контрольной группе;

При исследовании ткани почки было установлено, что концентрация цинка изменяется незначимо по сравнению с контрольной: до 24,1 мг/кг (при дозе 1 мг/кг - на 2,6%;  $p=0,9$ ) и значимо - до 50,1 мг/кг органа при дозе 100 мг/кг – т.е. в 2,1 раза,  $p < 0,001$ . Так же, как и при исследовании печени, наблюдается линейность возрастания концентраций цинка в диапазоне концентрации вводимых растворов от 5 до 10 мг/кг и нелинейный рост концентрации в диапазоне от 25 мг/кг (Рисунок 11).



Рисунок 11 - Изменение концентрации цинка в почке при различных вводимых дозах (n=6), 0 – контрольная группа

\* -  $p_n \leq 0,05$  по отношению к контрольной группе;

Не зафиксировано статистически значимого изменения концентрации цинка в шерсти: от 198,2 (контрольная группа) до 226 (доза – 100 мг/кг) мг/кг объекта – изменение 14,1%,  $p=0,4$  (Рисунок 12).



Рисунок 12 - Изменение концентрации цинка в шерсти при различных вводимых дозах (n=6); 0 – контрольная группа

\* -  $p_n \leq 0,05$  по отношению к контрольной группе;

При исследовании головного мозга (Рисунок 13) крыс не отмечено статистически значимого изменения концентрации цинка в ткани мозга всех экспериментальных подгрупп по отношению к контрольной. Наибольший прирост составил в подгруппе 100 мг/кг - 15,6%,  $p=0,1$ .



Рисунок 13 – Изменение концентрации цинка в головном мозге при различных вводимых дозах ( $n=6$ ), 0 – контрольная группа

\* -  $p_n \leq 0,05$  по отношению к контрольной группе;

При исследовании селезенки (Рисунок 14) крыс отмечено статистически значимое нарастание концентрации цинка в ткани селезенки при вводимой концентрации 100 мг/кг по отношению к контрольной группе: 49,8%,  $p=0,05$ . В других экспериментальных подгруппах не отмечалось значимых изменений концентрации цинка по отношению к контрольной.





Рисунок 14 – Изменение концентрации цинка в селезенке при различных вводимых дозах (n=6), 0 – контрольная группа

\* -  $p_n \leq 0,05$  по отношению к контрольной группе;

При сравнении соотношения концентрации цинка в органах и крови установлено, что это соотношение растет при введении растворов с концентрацией от 1 до 50 мг/кг массы тела и снижается при концентрации вводимого раствора 100 мг/кг (для печени – соответственно 10,3-12,3-13,8-28,6-27,4-19,0). Вероятно, это объясняется некоторым превышением «цинковой емкости» органов и возвратом несвязанного цинка в кровь.

### 3.2.2. Распределение свинца

Иная картина наблюдалась при введении крысам соединений свинца: во всех экспериментальных подгруппах наблюдалось статистически значимое увеличение концентрации по сравнению с контрольной группой.

В крови концентрация свинца значимо повышается при вводимой концентрации до 10 мг/кг, далее – увеличение прироста концентрации свинца, особенно при достижении концентрации 50 мг/кг: максимальный

прирост концентрации по сравнению с контролем составил 3400 раз,  $p < 0,001$  (Рисунок 15).



Рисунок 15 – Изменение концентрации свинца в крови при различных вводимых дозах ( $n=6$ ), 0 – контрольная группа

\* -  $p_n \leq 0,05$  по отношению к контрольной группе;

При возрастании дозы свинца до 5 мг/кг наблюдается статистически значимый рост концентрации его в почке (в 99 раз,  $p < 0,001$ ), при дальнейшем увеличении концентрации вводимого раствора наблюдается линейность прироста концентрации свинца в почке и увеличение концентрации свинца при концентрации от 50 до 100 мг/кг (в 3706 раз,  $p < 0,001$ ) (Рисунок 16).

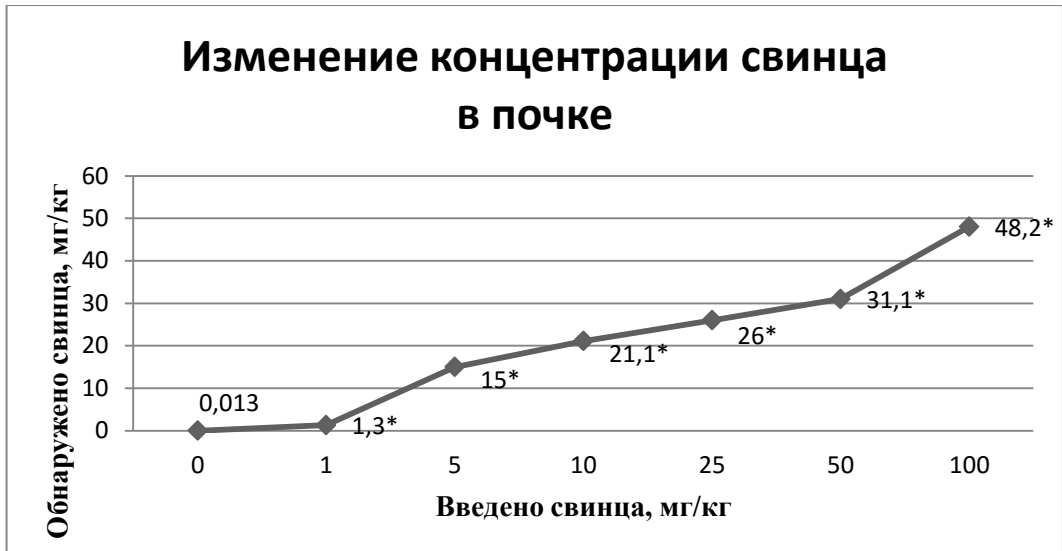


Рисунок 16- Изменение концентрации свинца в почке при различных вводимых дозах (n=6), 0 – контрольная группа

\* -  $p_n \leq 0,05$  по отношению к контрольной группе;

При возрастании вводимой дозы свинца до 10 мг/кг наблюдается значимое увеличение его концентрации в печени, при дальнейшем увеличении дозы вводимого раствора наблюдается линейность прироста концентрации, максимальное увеличение более чем в 14 тыс. раз,  $p < 0,001$  (Рисунок 17).



Рисунок 17 - Изменение концентрации свинца в печени при различных вводимых дозах (n=6), 0 – контрольная группа

\* -  $p_n \leq 0,05$  по отношению к контрольной группе;

Концентрация свинца в селезенке также изменяется неравномерно: увеличение в 10000 раз по сравнению с контролем ( $p < 0,001$ ) при концентрации 10 мг/кг, и более чем в 100000 раз при концентрации 100 мг/кг. Отмечается превышение депонирования соединений свинца в селезенке по сравнению с печенью от 4 (50 мг/кг) до 7,1 раз (100 мг/кг) (Рисунок 18).



Рисунок 18 - Изменение концентрации свинца в селезенке при различных вводимых дозах ( $n=6$ ), 0 – контрольная группа

\* -  $p_n \leq 0,05$  по отношению к контрольной группе;

Показательно изменение концентрации свинца в шерсти крыс – слабое накопление в диапазоне концентраций до 25 мг/кг и резкий рост при введении дозы от 50 мг/кг (418 раз,  $p < 0,001$ ), что, возможно, связано с превышением возможностей почек по выведению металла из органов и тканей и включению дополнительных механизмов его выведения (Рисунок 19).



Рисунок 19 - Изменение концентрации свинца в шерсти при различных вводимых дозах (n=6), 0 – контрольная группа

\* -  $p_n \leq 0,05$  по отношению к контрольной группе;

Динамика накопления свинца в головном мозге отличалось от показателей в других объектах: возрастание концентрации вводимого раствора от 1 до 100 мг/кг сопровождалось ростом обнаруженной концентрации в 111 раз по сравнению с контролем ( $p < 0,001$ ) (Рисунок 20).



Рисунок 20 - Изменение концентрации свинца в головном мозге при различных вводимых дозах (n=6); 0 – контрольная группа

\* -  $p_n \leq 0,05$  по отношению к контрольной группе;

### 3.3. Результаты исследования распределения цинка в тканях печени, почек и межклеточной жидкости

Проведенные исследования по исследованию распределения цинка внутри тканей органов животных показали, что для ткани почек доля ионных и водорастворимых соединений составляет 15,1% от общего содержания, для ткани печени эта доля составляет 13,6%, остальное количество цинка аккумулируется в клетках тканей (Таблица 15).

Таблица 15 - Распределение цинка в клетках тканей и межклеточной жидкости для образцов печени и почки

Наименование образца	Содержание Zn (n=3), мг/кг		Коэффициент распределения ( $C_{ж}/C_{вал}$ ), %
	в межклеточной жидкости	валовое	
почка	3,6±0,5	24,0±1,2	15,1
печень	9,6±3,8	70,5±4,2	13,6

### 3.4. Результаты исследования воздействия свинца на распределение цинка в органах и тканях крыс

Накопление материалов об одновременном действии ряда металлов, изучение распределения металлов и обобщение данных о влиянии отдельных металлов позволит подойти к выявлению механизма их действия в связи с особенностями их строения как элементов (атомов или ионов), а также в зависимости от поведения их в организме.

При изучении распределения свинца и цинка в тканях органов лабораторных крыс получены следующие результаты (Рисунок 21): при интоксикации соединениями свинца происходит увеличение его содержания в тканях почек и печени в 63 и 26 раз, соответственно, при этом содержание цинка увеличивается только в ткани печени в 1,7 раза. Известно, что свинец

блокирует SH-группы белков, тем самым быстро вызывает нарушения ферментативных реакций [Курляндский Б.А., 2002].

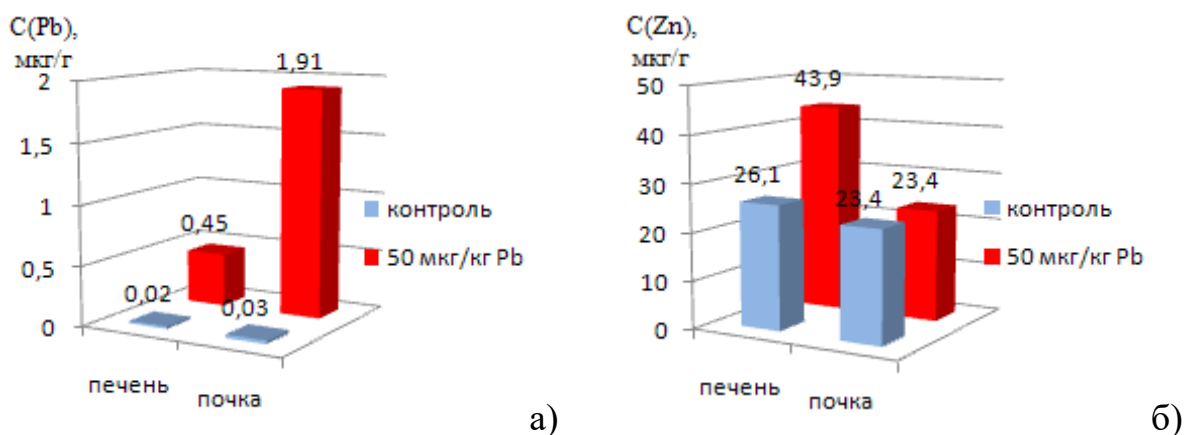


Рисунок 21 - Диаграмма распределения свинца (а) и цинка (б) в тканях печени и почек лабораторных крыс в отсутствии (контроль) и при наличии экзогенного поступления свинца

Избирательное накопление и длительность задержки металлов в ткани или органе в значительной степени определяют поражение того или иного органа. В эксперименте наиболее часто дистрофические изменения отмечаются в печени и почках, органах кумуляции и выделения многих металлов. Свинец поражает почечную ткань, в известной мере также накапливаясь в почках и выделяясь с мочой [Левина Э.Н., 1972].

Повышение отложения свинца в органах при свинцовой интоксикации зависит от проницаемости сосудисто-тканевых барьеров. В начальный период отравления наблюдается повышение проницаемости сосудов и гистогематических барьеров, характеризующееся повышенным выходом белка из сосудистого русла, накоплением его в органах. Повышенный выход воды из сосудистого русла ведет к снижению объема циркулирующей плазмы и увеличению внеклеточной жидкости [Макаренко Т. Ф., 2001].

Свинец, как известно, относится к ядам, длительно задерживающимся в организме. Однако выделение его происходит достаточно интенсивно, и пути последнего могут быть неодинаковы в разные периоды. Наиболее

интенсивно экскреция свинца идет в течение первых 12—24 часов; затем она значительно замедляется. Первая фаза выделения свинца, по-видимому, отражает элиминацию свободно циркулирующей ионной или слабо связанной формы металла, а вторая фаза - медленного выведения - представляет собою возможно удаление внутриклеточного связанного металла [Левина Э.Н., 1972].

Проведенные исследования по изучению распределения свинца и цинка внутри тканей органов животных показали, что для ткани почек 2,3% от общего содержания свинца находится во внеклеточной жидкости в форме ионных и водорастворимых соединений, для ткани печени эта доля составляет 2,9%, остальное количество свинца аккумулируется в клетках тканей. В случае цинка, доля ионных и водорастворимых соединений составляет - 15,1% - для ткани почек и 13,6% - для ткани печени (Рисунок 20).

Примененный подход позволяет проводить токсикологические исследования на тканевом уровне. Полученные данные несут ценную информацию для исследования процессов распределения и метаболизма соединений свинца и цинка при интоксикации соединениями свинца. Определение концентрации свинца во внеклеточной жидкости позволяет установить фазу интоксикации.

Накопление материалов об одновременном действии ряда металлов, изучение распределения металлов и обобщение данных о влиянии отдельных металлов позволит подойти к выявлению механизма их действия в связи с особенностями их строения как элементов (атомов или ионов), а также в зависимости от поведения их в организме.

Токсическое действие свинца также может проявляться и изменением в соотношении макроэлементов и других биогенных элементов (натрий, фосфор).



### **3.5. Результаты атомно-абсорбционного определения натрия для исследования степени токсического поражения органов животных соединениями свинца**

Натрий по содержанию в организме относится к макроэлементам. Уровень его содержания в биологических жидкостях нормируется в клинической диагностике, как один из показателей общего состояния организма, при наличии некоторых патологических процессов, а также при токсикологическом отравлении тяжелыми металлами. При определении натрия методом атомной абсорбции существует проблема мешающего влияния калия [Мазняк Н.В. и др., 2012 (а)].

В работе исследованы приемы устранения мешающего влияния калия при определении натрия в воздушно-ацетиленовом пламени. Использование хлорида цезия в концентрации 1% масс.в качестве спектроскопического буфера позволяет проводить определение натрия вплоть до соотношения Na:K=1:25.

Оптимизированы условия пламенного атомно-абсорбционного определения натрия (расход горючего газа, высота горелки). Для разложения биологических образцов предложено использование разложения проб в системе микроволновой подготовки «MARS-5» (CEM CORPORATION) в присутствии концентрированной азотной кислоты. Для определения натрия использовали атомно-абсорбционный спектрометр SolaarM6 ( $\lambda=589,0$  нм), воздушно-ацетиленовое пламя.

На основании проведенных исследований разработана методика атомно-абсорбционного определения натрия в биологических жидкостях, тканях внутренних органов, шерсти лабораторных животных в нормальных условиях (контрольная серия) и при интоксикации соединениями свинца. Результаты определения содержания натрия в органах и тканях представлены в таблице 16.

Таблица 16 - Содержание натрия в биологических образцах (P=0,95, n=6)

Наименование образца	Содержание натрия, мкг/г ( $\bar{X} \pm \Delta x$ )			
	контрольная серия		серия с введением 50 мкг/кг свинца	
	содержание	$S_r$	содержание	$S_r$
Шерсть	321±86	0,1	142,8±5,2	0,01
Цельная кровь	2705±301	0,04	1702±215	0,08
Ткань головного мозга	1409±99	0,04	1257±220	0,1
Ткань печени	1000±499	0,2	687±244	0,1
Ткань почки	1939±274	0,09	1765±583	0,2
Ткань селезенки	709±117	0,1	517±163	0,2

Показано, что при интоксикации соединениями свинца происходит снижение концентрации натрия в исследуемых образцах, однако изменения не имели статистической значимости ( $p=0,8-0,9$ ) и не могли быть использованы в качестве диагностического признака воздействия свинца. Методика позволяет селективно определять натрий в биологических образцах в присутствии калия от соотношения Na:K=1:1 до соотношения Na:K=1:25 и может быть использована при определении натрия в условиях наличия патологических процессов в организме. Предел обнаружения натрия по разработанной методике анализа составляет 0,002 мкг/мл.

Распределение свинца и цинка в исследованных органах и тканях крыс, изменение концентраций биогенных элементов (натрий, фосфор) указывают на наиболее вероятные органы-мишени для этих металлов – почку, печень, для изучения структурных изменений объекты подвергались гистологическому исследованию.

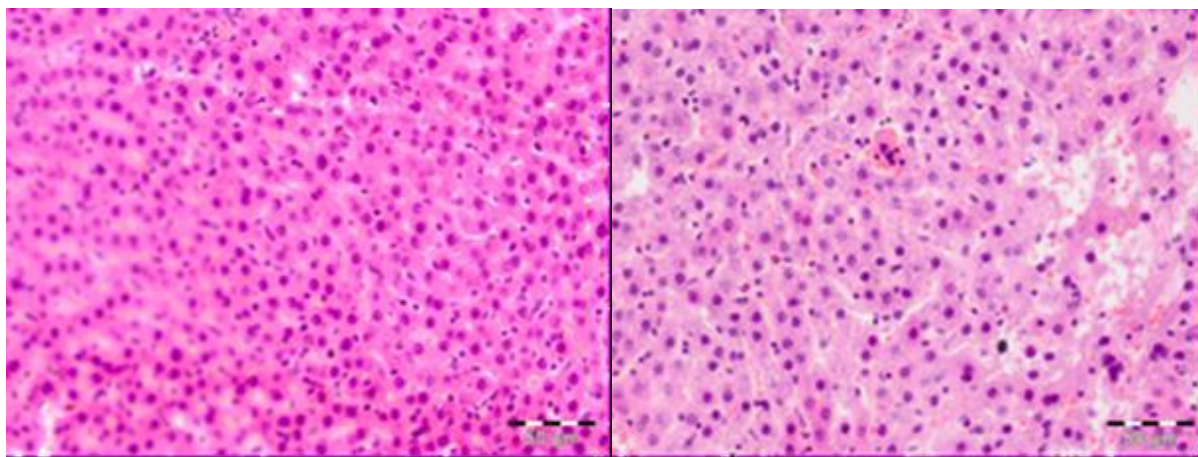
### 3.6. Результаты гистологического исследования тканей

Гистологические препараты подвергали обзорной микроскопии и морфометрии.

В органах экспериментальных животных наблюдалась различная гистологическая картина как внутри групп, так и между ними. При введении крысам растворов свинца выявлены более выраженные морфологические изменения в органах по сравнению с таковыми при введении растворов цинка.

### 3.6.1. Обзорная микроскопия

В печени животных из «свинцовой» группы дольково-балочная структура сохранена, порталные тракты не расширены, с инфильтрацией умеренным количеством лимфоцитов, гистиоцитов, эозинофилов. Сосуды с умеренным полнокровием. Гепатоциты обычного гистологического строения, некоторые с мелкими оптически пустыми вакуолями, что может свидетельствовать о мелкокапельной жировой дистрофии, очаговый некроз гепатоцитов (Рисунок 22).



а

б

Рисунок 22 – а – печень контрольной группы; б - печень «свинцовой» группы. Концентрация свинца – 100 мг/кг. Увеличение  $\times 400$ . Окраска – гематоксилин-эозин

Для препаратов почки животных из этой же группы характерно выраженное или умеренное полнокровие сосудов, капиллярно-венозное

полнокровие коркового и мозгового вещества. Эпителий проксимальных канальцев, расположенных субкапсулярно, с явлениями дистрофии, вакуолизацией цитоплазмы, частичным разрушением апикальных частей клеток, расширением просвета, отмечается очаговый некроз эпителия извитых проксимальных и дистальных канальцев. Кроме того, канальцы в юкстамедуллярной зоне и в мозговом веществе с выраженным расширением просвета. Наблюдались выраженный интерстициальный отёк и очаговая инфильтрация стромы лимфоцитами и гистиоцитами, гиалиново-капельная и гидропическая дистрофия в эпителии собирательных трубочек (Рисунок 23).

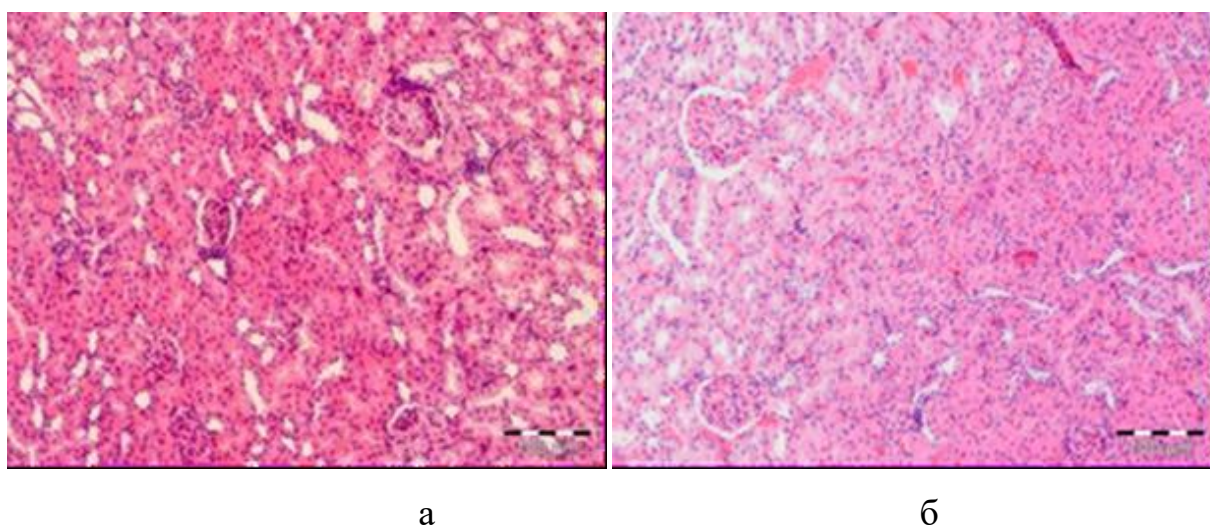
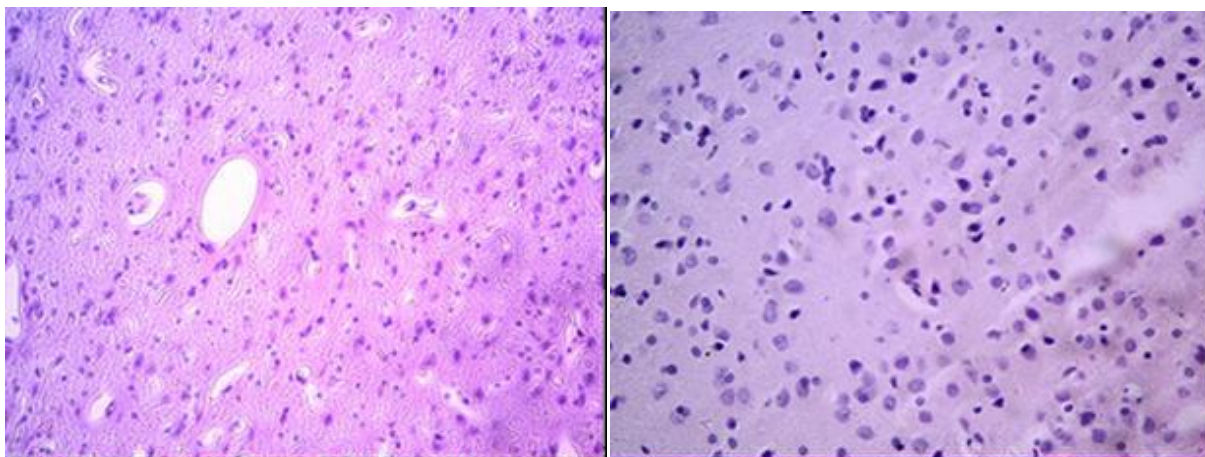


Рисунок 23 – а – почка контрольной группы; б - почка «свинцовой» группы. Концентрация свинца – 100 мг/кг. Увеличение х400. Окраска – гематоксилин-эозин

В головном мозге отмечаются капиллярно-венозное полнокровие, перицеллюлярный и периваскулярный отёк от умеренного до выраженного, диффузно-очаговая демиелинизация, очаговая дистрофия нейронов разной степени выраженности, часть нейронов – в состоянии острого набухания, с явлениями хроматолиза, вплоть до тотального, реактивный астроцитоз (Рисунок 24).



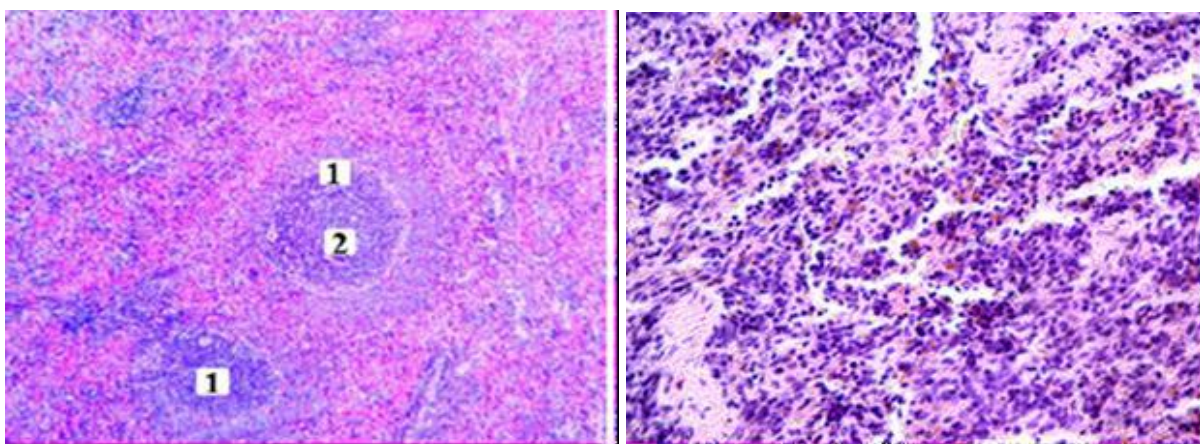


а

б

Рисунок 24 – а – головной мозг контрольной группы; б - головной мозг «свинцовой» группы. Концентрация свинца – 100 мг/кг. Увеличение x400. Окраска – гематоксилин-эозин

В селезенке наблюдаются очаги некроза, диффузный гемосидероз (Рисунок 25).



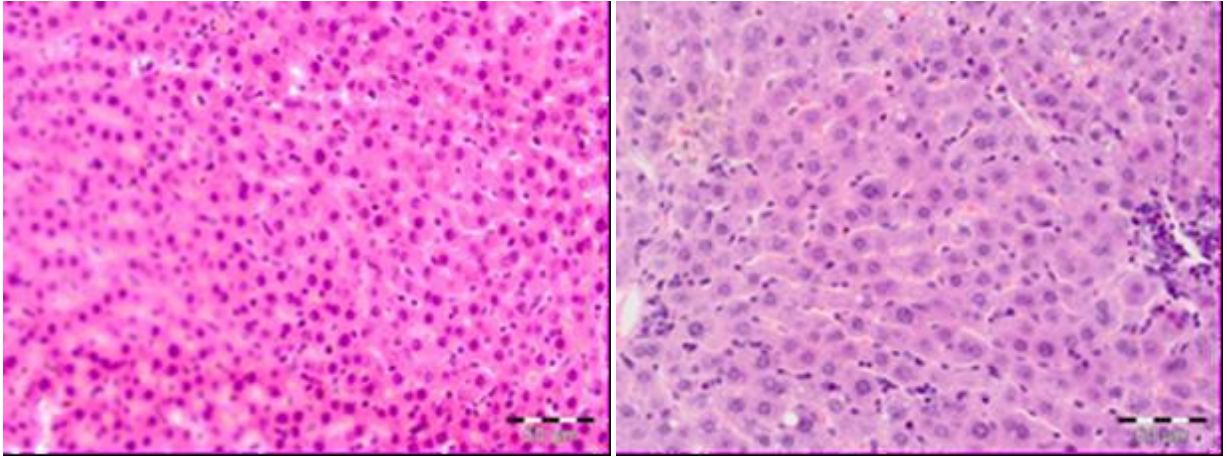
а

б

Рисунок 25 – а - селезенка контрольной группы; б - селезенка «свинцовой» группы. Концентрация свинца – 100 мг/кг. Увеличение x400. Окраска – гематоксилин-эозин

В печени животных из «цинковой» группы дольково-балочная структура сохранена, портальные тракты не расширены, с большим количеством эозинофилов, лимфоцитов, гистиоцитов, единичными

нейтрофилами. Отмечается полнокровие преимущественно центральных вен и сосудов портальных трактов. У некоторых групп гепатоцитов в цитоплазме определяются мелкие вакуоли в цитоплазме, что может свидетельствовать о жировой дистрофии. Такие группы гепатоцитов располагаются как по периферии долек, так и вокруг центральных вен (Рисунок 26).



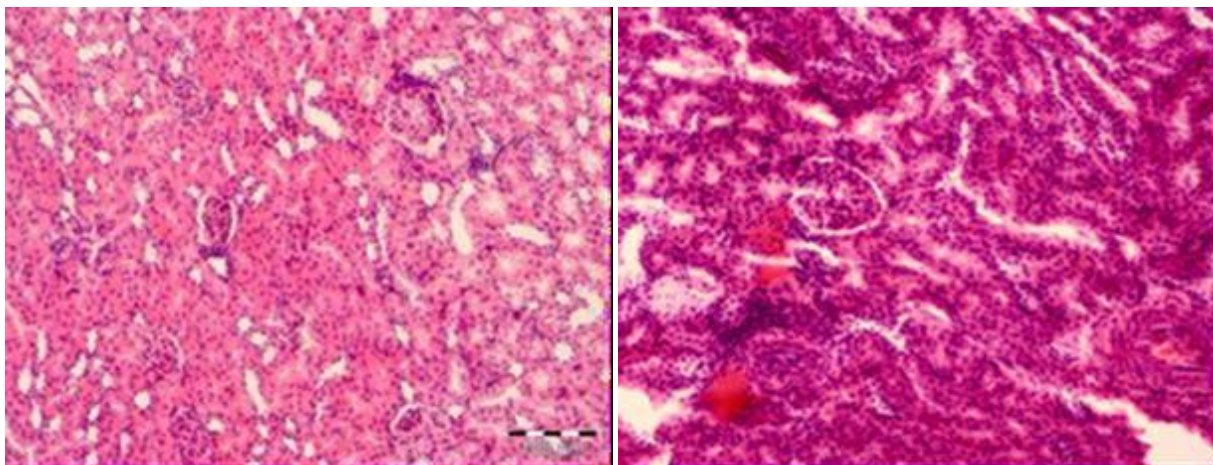
а

б

Рисунок 26 – а – печень контрольной группы; б - печень «цинковой» группы. Концентрация цинка – 100 мг/кг. Увеличение x400. Окраска – гематоксилин-эозин

В почках отмечается умеренное полнокровие сосудов. Эпителий проксимальных канальцев, расположенных субкапсулярно, с явлениями дистрофии, вакуолизацией цитоплазмы, частичным разрушением апикальных частей клеток, расширением просвета (Рисунок 27).



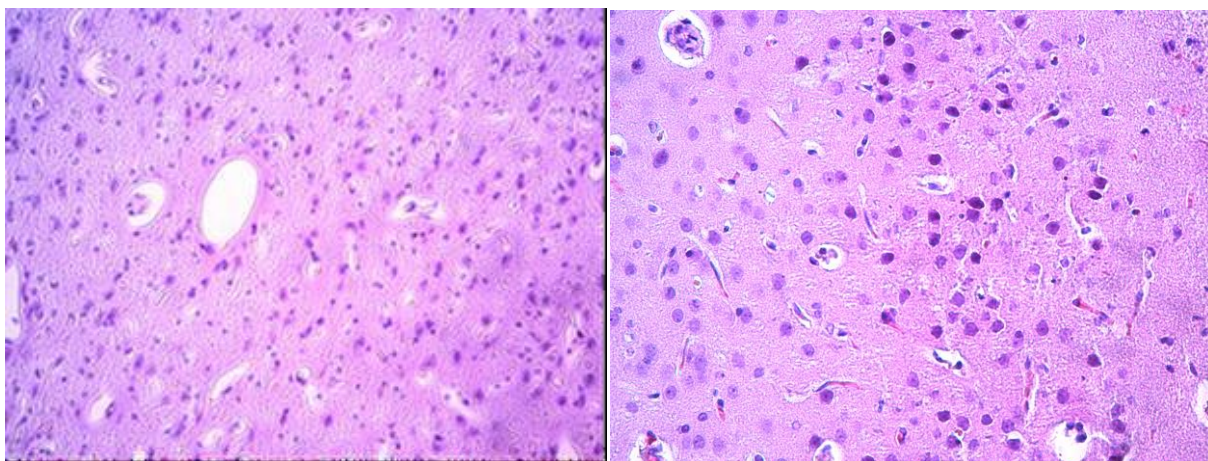


а

б

Рисунок 27 – а – почка контрольной группы; б - почка «цинковой» группы. Концентрация цинка – 100 мг/кг. Увеличение  $\times 400$ . Окраска – гематоксилин-эозин

В головном мозге наблюдаются выраженный перичеллюлярный и периваскулярный отёк, дистрофия, некробиоз, очаговый некроз, очаги глиоза, стаз (Рисунок 28).



а

б

Рисунок 28 – а – головной мозг контрольной группы; б- головной мозг «цинковой» группы. Концентрация цинка – 100 мг/кг. Увеличение  $\times 400$ . Окраска – гематоксилин-эозин

В печени животных **контрольной** группы дольково-балочная структура сохранена, крупные портальные тракты инфильтрированы

небольшим количеством лимфоцитов, гистиоцитов, эозинофилов. Сосуды с умеренным полнокровием (Рисунок 22 а).

Почки животных этой же группы обычного гистологического строения, крупные сосуды полнокровны (Рисунок 23 а). Головной мозг и селезенка также обычного гистологического строения (Рисунки 24 а, 25 а)

### **3.6.2. Морфометрическое исследование почки**

Морфометрия. В препаратах почек измеряли наружный и внутренний диаметры проксимальных канальцев в корковом веществе, площадь почечных телец, капиллярных петель сосудистых клубочков с внутренним листком капсулы и полости капсулы (мочевое пространство).

В препаратах печени измеряли площадь гепатоцитов и их ядер, рассчитывали ядерно-цитоплазматическое отношение (ЯЦО) - отношение между площадями ядра и цитоплазмы клетки, важную морфологическую характеристику, позволяющую оценить уровень метаболизма, выявить проявление компенсаторных реакций.

Установлено, что изменения в почках всех обследованных крыс, подвергавшихся воздействию соединений свинца и цинка, имеют различную форму и степень тяжести.

Кроме того, проведенное исследование выявило особенности строения мезонефроса изученных крыс, проявляющиеся в неоднородности структуры нефронов в пределах даже одной почки, которые могут отличаться размерами почечных телец, размерами мочевых пространств, диаметрами проксимальных отделов извитых канальцев.

Также в эпителии канальцев были выявлены дистрофические изменения различных степеней развития.

У животных, которым вводили соединение свинца, отмечается статистически значимое уменьшение площади почечного тельца с 7090 до



6380 кв. мкм ( $p=0,01$ ) и сосудистого клубочка с 6130 до 5320 кв. мкм ( $p=0,01$ ) по сравнению с животными контрольной группы (Таблица 15).

У животных, которым вводили соединение цинка, отмечается статистически значимое увеличение площади почечного тельца с 7090 до 8100 кв. мкм ( $p=0,01$ ) и сосудистого клубочка с 6130 до 6660 кв. мкм ( $p=0,01$ ) по сравнению с животными контрольной группы (Таблица 15).

При сравнении между собой площади мочевого пространства отмечается статистически значимое увеличение этого пространства с 960 до 1060 (свинец) ( $p=0,01$ ) и 1440 (цинк) кв. мкм ( $p=0,01$ ) у животных, которым вводили соответствующие соли тяжелых металлов. Наибольшее увеличение наблюдается у крыс, которым вводили ацетат цинка (Таблица 17).

Наружный диаметр проксимальных канальцев имеет достоверные различия между животными контрольной и экспериментальных групп. Внутренний диаметр проксимальных канальцев не имеет достоверных отличий между животными контрольной и экспериментальной группы, которым вводили ацетат свинца, вместе с тем наблюдается статистически значимое различие у животных экспериментальной группы, которым вводили ацетат цинка, по сравнению с животными контрольной группы (Таблица 17). В связи с изменением внутреннего и наружного диаметра проксимальных канальцев изменяется и высота эпителия канальцев, т.е.  $\frac{1}{2}$  разности между наружным и внутренним диаметром канальцев. В экспериментальных группах наблюдается статистически значимое увеличение высоты эпителия канальцев (Таблица 17).

Таблица 17 - Морфометрические показатели почки крыс при воздействии свинца и цинка

Показатель	Контроль	Свинец	p	Цинк	p
Площадь почечного тельца, мкм <sup>2</sup>	7090 [6300; 7710]	6380 [5760; 6950]	0,01	8100 [7220; 8980]	0,01
Площадь	6130 [5520;	5320 [4750;	0,01	6660 [6000;	0,01

сосудистого клубочка, мкм <sup>2</sup>	6710]	5900]		7300]	
Площадь мочевого пространства, мкм <sup>2</sup>	960 [860; 1080]	1060 [965; 1200]	0,01	1440 [1300; 1600]	0,01
Наружный диаметр проксимальных канальцев, мкм	23 [18; 24]	24 [20; 27]	0,05	26 [24; 30]	0,05
Внутренний диаметр проксимальных канальцев, мкм	3,06 [2,5; 3,14]	3,04 [2,8; 3,31]	0,6	4,6 [4,3; 5,0]	0,01
Высота эпителия почечных канальцев, мкм	9,7 [9,0; 10,7]	10,5 [9,6; 11,7]	0,01	10,5 [9,7; 11,6]	0,01

р - значимость различий по критерию Манна-Уитни

### 3.6.3. Морфометрическое исследование печени

При сравнении средней площади ядер гепатоцитов животных экспериментальных групп отмечается статистически значимое увеличение размера ядер «цинковой» группы по сравнению с животными контрольной группы, статистически незначимое изменение площади ядер у животных «свинцовой» группы. Вместе с тем, при сравнении средней площади гепатоцитов отмечается статистически значимое уменьшение размеров гепатоцитов «свинцовой» группы по сравнению с животными контрольной группы и статистически значимое увеличение этого показателя в «цинковой» группе (Таблица 18).

При сравнении среднего ЯЦО отмечается статистически значимое увеличение этого показателя у животных обеих экспериментальных групп по сравнению с животными контрольной группы. У животных экспериментальной группы, которым вводился ацетат свинца, ЯЦО гораздо выше за счет уменьшения площади гепатоцита (Таблица 17).

Таблица 18 - Морфометрические показатели печени крыс при воздействии свинца и цинка

Показатель	Контроль	Свинец	p	Цинк	p
Площадь ядер гепатоцитов, мкм <sup>2</sup>	34 [30; 38]	35 [31; 38]	0,9	44 [39; 49]	0,01
Площадь гепатоцитов, мкм <sup>2</sup>	252 [230; 280]	189 [158; 196]	0,01	280 [240; 310]	0,01
ЯЦО	0,14±0,04	0,20±0,05	0,001	0,16±0,04	0,001

p - значимость различий по критерию Манна-Уитни

Для печени характерно увеличение ядерно-цитоплазматического отношения (ЯЦО) при поступлении свинца с 0,14±0,04 до 0,20±0,05 и цинка – с 0,14±0,04 до 0,16±0,03.

Таким образом, установлено, что маркерами эффектов свинца и цинка в почке являются почечное тельце, мочевое пространство, сосудистый клубочек, проксимальные канальца; в печени – гепатоциты и их ядра. Возник вопрос о молекуле-маркере. Мы остановили выбор на металлотионеинах – белках, активно участвующих в связывании тяжелых металлов.

### 3.7. Результаты выявления экспрессии металлотионеина иммуногистохимическим методом

Способность ряда металлов индуцировать синтез металлотионеина в первичных культурах гепатоцитов крысы была проверена в результате прямого воздействия агента на печень или в результате косвенного (физиологической реакции) на агента. Экспериментально показано, что цинк является прямым индуктором синтеза МТ в печеночной ткани. В противоположность этому, свинец, который не увеличивает содержание МТ в гепатоцитах, по-видимому, индуцирует синтез МТ-1 в естественных условиях косвенными механизмами [Bracken W.M, 1987].

Экспрессия МТ у животных контрольной группы носила слабовыраженный характер в почках и печени (Рисунок 30, 32), не наблюдалась в головном мозге (Рисунок 34), селезенке. При свинцовой и цинковой интоксикации у животных экспрессия МТ изменяется (Таблица 19).

Таблица 19 - Результаты ИГХ-исследования

	Контроль					Свинец					Цинк				
	4+	3+	2+	+	-	4+	3+	2+	+	-	4+	3+	2+	+	-
<b>Головной мозг</b>					3					3			1	2	
<b>Печень</b>				3		2	1								3
<b>Почка</b>				2	1	3									3
<b>Селезенка</b>					3					3					3

Из контрольных образцов экспрессия металлотioneина выявлена в 3 образцах печени (100%), 2 образцах почки (66,7%), не выявлена в головном мозге и селезенке. В экспериментальных группах: при свинцовой интоксикации экспрессия МТ выявлена в 3 образцах печени и почки (100%), не выявлена в селезенке и головном мозге, при цинковой интоксикации – выявлена в 3 образцах головного мозга (100%), не выявлена в образцах печени, почки, селезенки.

**При свинцовой интоксикации** экспрессия МТ-1 в почках носит выраженный характер - равномерная экспрессия в эпителии собирательных трубочек и неравномерная, умеренная – в почечном тельце, более интенсивная - в области ЮГА (Рисунок 29).

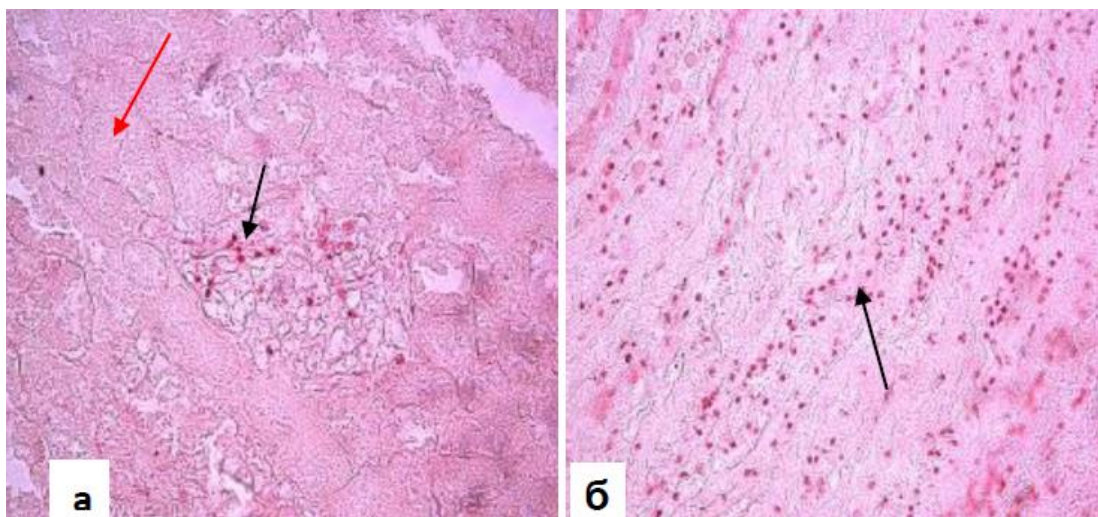


Рисунок 29 - Иммуногистохимическое исследование почек при введении свинца. а – выраженная экспрессия МТ в отдельных эндотелиоцитах гломерулярных капилляров (черная стрелка); отсутствие экспрессии МТ в некротизированных эпителиоцитах извитых канальцев (красная стрелка ); б – выраженная экспрессия МТ в эпителиоцитах собирательных трубочек. Увеличение x400

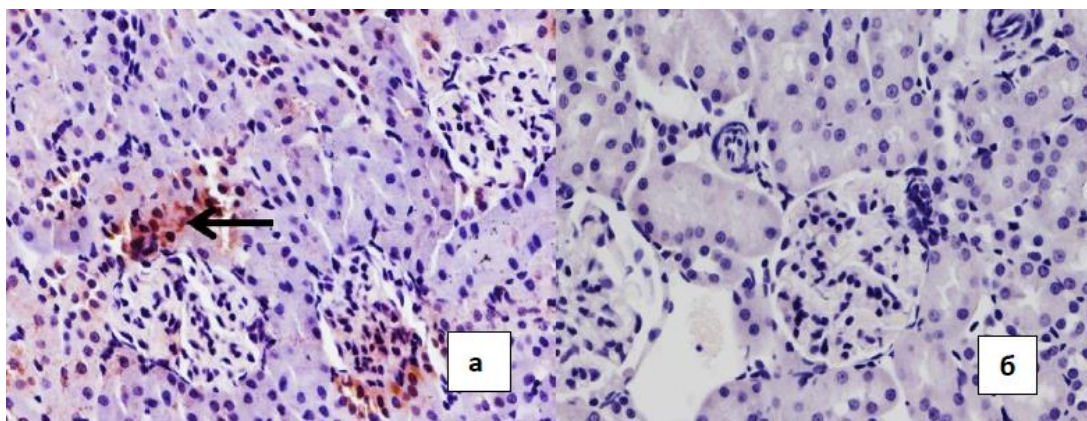


Рисунок 30 - Контрольная группа: а - единичные позитивные клетки в почке, антитела к МТ-1; б – негативное иммуноокрашивание без антител, почка. Увеличение x400

В печени – выраженная и неравномерная экспрессия МТ в гепатоцитах 3 зоны ацинуса (Рисунок 31).



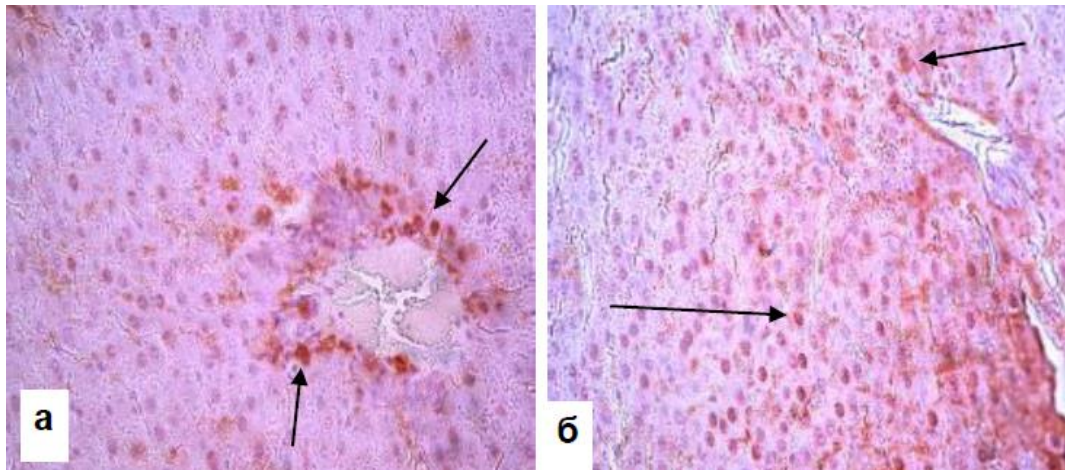


Рисунок 31 - Иммуногистохимическое исследование печени при введении свинца. а – выраженная экспрессия МТ в перивенулярных гепатоцитах. б – умеренная экспрессия МТ в гепатоцитах третьей зоны ацинуса. Увеличение x400

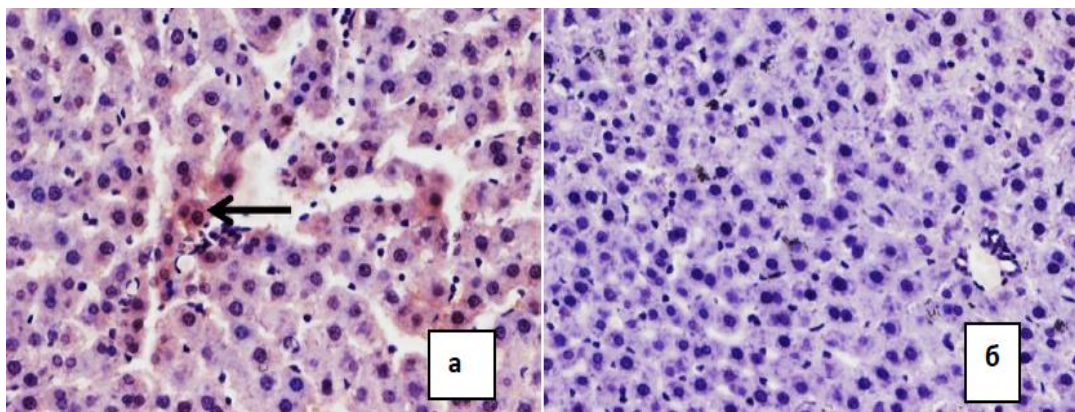


Рисунок 32 - Контрольная группа: а - единичные позитивные клетки в печени, антитела к МТ-1; б – негативное иммуноокрашивание без антител, печень. Увеличение x400

В селезенке и головном мозге не выявлено экспрессии МТ, что, вероятнее всего, связано с высокой токсичностью свинца, сопровождающейся тяжелым повреждением селезенки и головного мозга.

**Введение цинка** сопровождалось менее выраженными патологическими изменениями в органах и характеризовалось преимущественно нарушением кровообращения и слабо выраженной дистрофией в паренхиме. В головном мозге – капиллярно-венозное

полнокровие, слабо выраженный отёк периваскулярный и перицеллюлярный, очаговая дистрофия нейронов, умеренно выраженная, очаги глиоза, продуктивный васкулит. В почках, печени, селезенке – капиллярно - венозное полнокровие, паренхиматозная белковая и жировая дистрофия, слабо и умеренно выраженная.

Нами отмечена слабая экспрессия МТ в части нейронов головного мозга, элементах глии и эндотелиоцитах (Рисунок 33), отсутствие экспрессии МТ в контрольной группе (Рисунок 45).

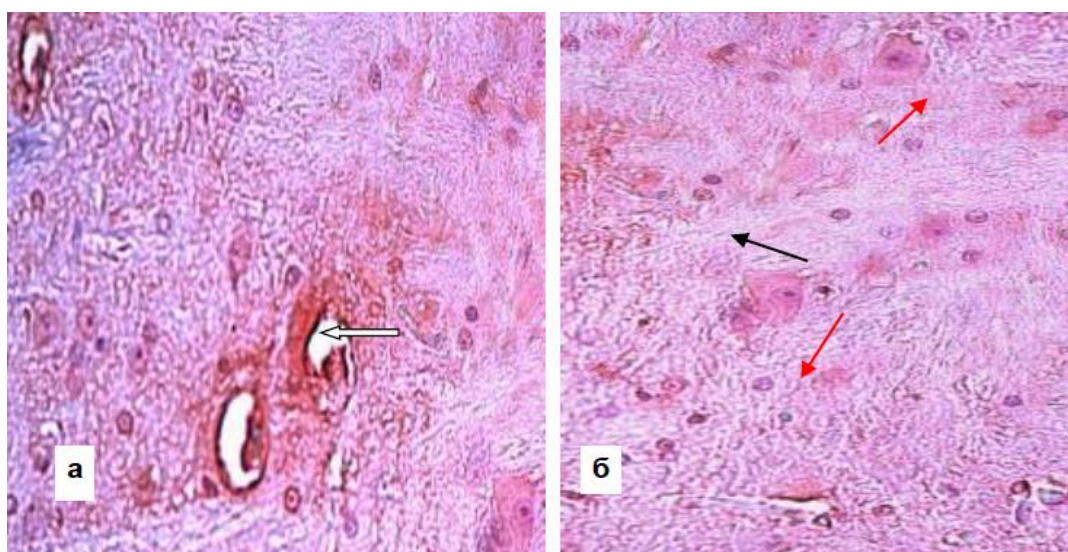


Рисунок 33 - Иммуногистохимическое исследование головного мозга при введении цинка. а, б – слабая экспрессия металлотioneина в эндотелиоцитах, цитоплазме клеток глии и нейронов. Увеличение x400

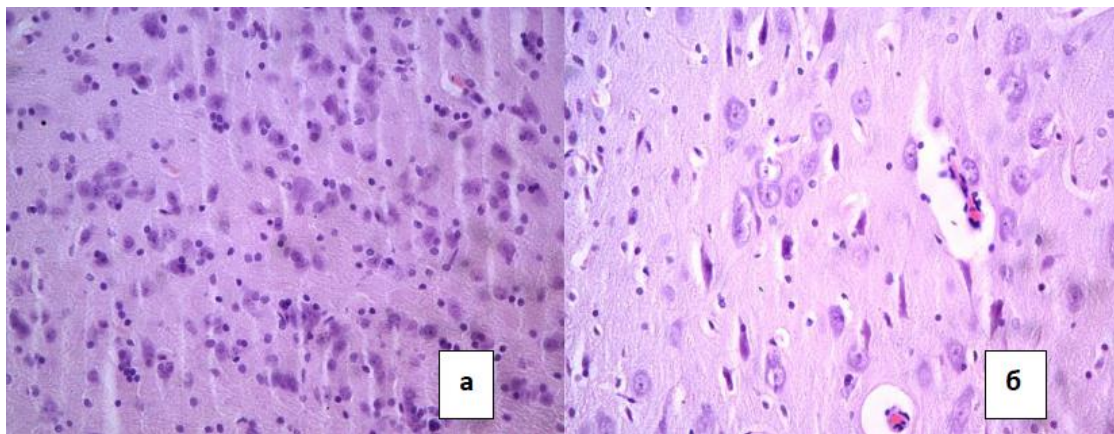


Рисунок 34 - Контрольная группа: а - негативное иммуноокрашивание в головном мозге, антитела к МТ-1; б – негативное иммуноокрашивание без антител, головной мозг. Увеличение x400

### Заключение

Имуногистохимические исследования в настоящее время, несомненно, должно стать обязательной частью судебно-медицинского экспертного исследования, поскольку только они обеспечивает специфическую визуализацию локализации в тканях клеток, их рецепторов и даже отдельных генов. Они позволяют изучать секреторные, экссудативные и репаративные процессы фактически на молекулярном уровне. При большинстве видов отравлений именно на молекулярном уровне находятся патохимические мишени действия яда, и метод ИГХ позволяет эти процессы визуализировать [Ковалев А. В. и др., 2015; Богомолов Д. В., 2013; Франк Г. А., 2011; Коржевский Д. Э., 2012]. Учитывая результаты проведенного иммуногистохимического исследования считаем, что описанный протокол позволяет выявлять МТ-1 как маркер воздействия свинца и цинка и может быть эффективно использован при судебно-медицинском исследовании органов в случаях острого отравления соединениями этих металлов.



## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

### 4.1. Применение атомно-абсорбционной спектрометрии при проведении судебно-химических исследований в качестве метода доказательной медицины

При определении микроэлементов в объектах были использованы основные принципы концепции STPF, предложенной Slavin et al., в частности: коррекция неселективного поглощения, рекомендуемые производителем прибора температурно-временные параметры нагрева графитовой печи, импульсный режим питания ламп с полым катодом и интегральный способ регистрации сигнала, использование атомизаторов с платформой Львова; химическая модификация. В качестве модификатора матрицы был выбран нитрат палладия (20мкг/мл), который не только стабилизирует элементы в атомизаторе, но и способствует эффективному окислению органической матрицы при умеренных температурах пиролиза, длины волн для цинка – 213,9 и 307,6 нм, для свинца – 283,3 нм.

Сложный матричный состав исследованных объектов, содержащий значительные количества органических и неорганических компонентов, вносит основной вклад в величину неселективного поглощения в ААС-ЭТА. Для устранения значительного неселективного поглощения применяли атомно-абсорбционный спектрометр.

В работе представлены результаты исследований по изучению содержания 2 элементов методами ПААС, ЭТААС. Дан сравнительный анализ определения элементов спектральными методами, показаны преимущества и недостатки каждого из них. Использование очищенной азотной кислоты и микроволнового разложения проб позволило определить более низкие уровни тяжелых металлов. Так как метод имеет хорошую чувствительность, он является наиболее вероятным кандидатом для

многоэлементного анализа в биологии и медицине [Андрусишина И.Н., 2009].

В настоящее время для целей экспертной практики существует всего несколько нормативных документов с утвержденными методиками выполнения измерений концентраций неорганических токсикантов в биосубстратах [Приказ Минздравсоцразвития России от 12.05.2010 г. № 346н; Патент (RU 2410691)], отсутствуют нормативная документация по отбору, хранению, транспортировке, подготовке к анализу биосубстратов крови, мочи, волос с достоверно установленными концентрациями токсичных веществ, нормативы погрешности, достоверности и надёжности полученных аналитических данных в биосубстратах.

Эксперимент позволил уточнить в модельных условиях некоторые особенности распределения цинка и свинца в организме крыс:

- параметры поглощения, распределения элементов в тканях и органах экспериментальных животных;
- выявить зависимость между уровнем воздействия элемента и его содержанием в биологическом материале;
- правильно выбрать биологический материал для проведения биологического контроля, что достигается использованием различных биосред.

**Выбор объектов для судебно-химического исследования.** При выборе объектов для судебно-химического исследования следует руководствоваться принципами необходимости и достаточности комплекса исследований, а также принципами доказательной медицины.

Наиболее широко используемым биологическим материалом, который отвечает всем указанным требованиям, является моча, однако этот объект не использовался в эксперименте в связи с определенными трудностями в сборе мочи. Кроме этого, биосубстратами могут служить также волосы, ногти, слюна, выдыхаемый воздух, кровь и т.д. [МР Минздрава СССР от 7 декабря 1990 г. № 5205-90].

Выбор цельной крови, а не её элементов для судебно-химического исследования обусловлен невозможностью разделения трупной крови на компоненты.

Кровь – важный компонент системы гомеостаза; равновесие элементного состава поддерживается за счет непрерывного перемещения химических элементов между кровью и функциональными органами на фоне постоянных метаболических изменений в живом организме. Волосы представляют собой «запоминающую ткань», несущую интегральную информацию за определенный промежуток времени, поскольку вещества после попадания в волос остаются там, теряя возможность вернуться в основной метаболический пул организма [Момчилович Б., 2005].

При проведении эксперимента установлено, что волосы (шерсть) не являются надежным информативным показателем воздействия металлов, вместе с тем во многих исследованиях концентрация металлов в волосах используется для оценки эколого-эпидемиологической ситуации. Анализ крови представляет собой исследование одномоментного характера, в то время как анализ волос несет в себе черты динамического исследования в силу специфики анализируемого материала.

Руководствуясь вышеизложенным и учитывая результаты проведенных экспериментальных исследований, мы предлагаем при судебно-химических исследованиях на наличие свинца проводить исследование крови, почки, печени, селезенки; при судебно-химических исследованиях на наличие цинка проводить исследование крови, почки, печени, селезенки – методом атомно-абсорбционной спектроскопии.

Таким образом, показана возможность применения ААС для прямого анализа биологических образцов на содержание свинца и цинка. За счет ускорения процедуры пробоподготовки время на проведение одного анализа лимитируется только производительностью атомно-абсорбционного спектрометра и составляет несколько минут на определение элемента. Данный способ измерения упрощает и удешевляет анализ, повышает его

точность. Предложенный подход перспективен для приборов с одновременной регистрацией нескольких элементов. Практически полное устранение неселективного поглощения позволяет рассчитывать на применимость данного способа измерения при прямом анализе других биологических объектов. Результаты данного исследования могут быть применены в экспертной практике.

Особое значение приобретает создание методического обеспечения на основе использования аналитического оборудования, отвечающего современным требованиям унификации и стандартизации методов исследований.

В процессе проведения экспериментального исследования применена схема подготовки образцов, позволяющая минимизировать различные влияния, в т.ч. матричные. Описанные условия эксперимента позволили установить достоверные различия уровней свинца и цинка в различных образцах при различных дозах воздействия на крыс.

Предлагаемый комплекс методов позволяет установить причинно-следственные связи и зависимости, возникающие при однократной экспозиции свинца и цинка, обосновать применение комплексного подхода к оценке токсического воздействия свинца и цинка при проведении судебно-химических исследований.

Сравнительная оценка концентраций свинца и цинка, морфологических изменений в почке и печени, наблюдаемых при остром воздействии элементов, уровня экспрессии маркера эффекта – металлотioneина-1 в различных органах крыс позволила предложить необходимый и достаточный алгоритм и набор методов оценки токсического воздействия свинца и цинка на организм.

Предложенный алгоритм проведения судебно-химических исследований внедрен в экспертную практику КГБУЗ «ККБСМЭ», в частности, измерение концентрации «тяжелых металлов» в трупном материале предлагаемым способом проведено в трех случаях в 2016 году.

## **4.2. Обсуждение результатов проверки правильности и воспроизводимости методики определения концентрации свинца и цинка**

Одним из наиболее важных и ответственных вопросов оценки результатов спектрального анализа, связанных с определением количественного содержания элементов в органах, тканях, выделениях и жидкостях организма человека является сопоставление с «нормальным» содержанием этих элементов [Войнар, А. О., 1960; Крылова, А. Н., 1975; Ершов, Ю. А., 1989; Герасименко, Т. И. 1996; Кудрин, А. В., 2000; Калетина, Н. И., 2004].

Данные, относящиеся к точному определению концентраций микроэлементов, топографии их распределения и различных органах и перераспределению при различных состояниях организма в настоящее время разработаны еще недостаточно. Совершенно нечетко определено и само понятие «норма».

Особенность судебно-химических исследований заключается в том, что к ним предъявляются строгие и весьма определенные требования, включающие выбор системы исследования, тщательность подбора объектов, объективность оценки сравниваемых данных и т.д.

Оценка полученных данных, несомненно, позволяет получить информацию о распределении элементов в различных органах и тканях человека, что может быть использовано при судебно-медицинской экспертизе трупа с помощью ААС.

Чрезвычайно сложно сравнить концентрации элементов в «норме», если они получены применительно к одним и тем же объектам исследования, но находившимся в разном агрегатном состоянии, в разных единицах. Кроме того, в отдельных случаях сопоставляются концентрации элементов в разных органах и тканях в «норме», полученные с помощью разных методов исследования с различной точностью и воспроизводимостью.

Применительно к задачам судебно-химической экспертизы следует дифференцированно подходить к выбору сопоставляемых объектов. При подозрении на наступление смерти от отравления «металлическими» ядами спектральный анализ органов и тканей из трупа необходимо проводить параллельно с пробами аналогичных органов и тканей из коллекции спектральной лаборатории (условная «норма»), что позволяет выявлять повышенное содержание конкретных химических элементов в представленных на анализ объектах [Назаров Г.Н., 1994].

Для проверки правильности результатов измерения содержания микроэлементов в исследуемых образцах использованы методы «введено-найдено», варьирования навески и сравнение результатов с результатами, полученными методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой. При использовании метода «введено-найдено» в исследуемые пробы вводилось известное количество свинца, внесенная добавка обнаружена с процентной мерой правильности 98,9% и относительной погрешностью 0,11 и 0,07% соответственно. Таким образом, поскольку внесенная в образец добавка свинца практически полностью обнаружена, можно предположить, что результаты определения свинца в исследуемых объектах достаточно надежны и корректны. Положительные результаты алгоритмов оперативного контроля процедуры измерений с использованием трёх методов проверки правильности результатов позволяют признать процедуру измерений удовлетворительной.

#### **4.3. Динамика накопления микроэлементов в организме экспериментальных животных**

Динамика накопления свинца, цинка и их распределение по органам и тканям организма представляется достаточно важной информацией для понимания картины отравления этими ТМ, для оценки степени их

токсического действия и, в конечном итоге, для терапии подобных отравлений.

Нами была поставлена задача - изучить динамику накопления свинца и цинка такими органами и тканями крыс как почки, селезенка, головной мозг, печень, а также шерсть и кровь.

Данные, относящиеся к точному определению концентраций микроэлементов, топографии их распределения и различных органах и перераспределению при различных состояниях организма в настоящее время разработаны еще недостаточно. Совершенно нечетко определено и само понятие «норма». В судебной медицине в силу ее довольно специфических задач, речь может идти в основном только о данных физиологического разброса содержания микроэлементов в различных органах, тканях и выделениях человека с учетом значительного числа факторов (конкретная биогеохимическая провинция, в которой проживал человек; характер его питания, профессия, физическое состояние и др.). Причем, такой разброс данных об элементном составе присущ, как правило, лишь данной изучаемой группе людей и не может быть использован во всех случаях в качестве некой отвлеченной «нормы» при проведении научных исследований и судебно-медицинских экспертиз [Назаров Г.Н., 1994].

Отличительной особенностью судебно-медицинских исследований является то, что к ним предъявляются строгие и весьма определенные требования, включающие выбор системы исследования, тщательность подбора объектов, объективность оценки сравниваемых данных и т.д.

Важным компонентом диссертационного исследования явилось экспериментальное обоснование роли эссенциальных и токсичных элементов в формировании структуры и функции органов, вовлеченных в процессы токсикокинетики металлов. Экспериментальное исследование было нацелено на разрешение нескольких малоизученных вопросов. Среди них – установление особенностей распределения эссенциального (цинк) и

токсичного (свинец) микроэлементов в организме животных, а также описание динамики накопления токсичных цинка и свинца в организме.

Кроме того, была проведена оценка сил влияния указанных факторов на морфофункциональные параметры органов, были определены и проанализированы концентрации микроэлементов в различных органах и тканях, что позволило выделить органы-мишени с преимущественным накоплением свинца, цинка и охарактеризовать особенности их распределения в организме животных.

Важной особенностью накопления микроэлементов в организме животных является, так называемая, «гомеостатическая емкость» [Скальный А.В., 2004] организма по отношению к микроэлементу.

Особенностью распределения цинка в организме является накопление его в больших количествах, обусловленное, по-видимому, его высокой биологической активностью. Интенсивное включение цинка в ткань печени, мозга, очевидно связано с высокой активностью происходящих в них биохимических процессов, обильным кровоснабжением и активным участием цинка в ферментативных реакциях организма. На смертельном уровне затравки свинец и цинк оказывают антагонистический эффект, а на эффективном - оказывают синергическое действие [Бурханов А.И., 1982].

Ткани мозга, наряду с почками и печенью, являются наиболее «реактивной» из исследованных структур организма в отношении свинца. Анализ полученных данных позволяет сделать некоторые выводы, которые могут оказаться полезными для понимания токсического действия свинца. Почки, головной мозг и печень раньше других исследованных органов и тканей начинают накапливать свинец и, по-видимому, раньше других начинают страдать от этого токсиканта, т.е. первые симптомы отравления могут проявиться в работе нервной системы и почек. Печень и почки являются основными органами кумуляции свинца в организме, концентрация металла в них увеличивается в сотни раз. Ткани мозга одними из первых



подвергаются действию свинца, несмотря на то, что в них наблюдается незначительное увеличение концентрации этого металла.

#### **4.4. Связь элементного статуса со структурными изменениями почек и печени**

Нами проведено изучение взаимосвязи элементного статуса со структурными и функциональными особенностями почек и печени.

При анализе взаимосвязи уровня накопления химических элементов с наличием изменений почек и печени показано, что наиболее характерной особенностью явился существенно более высокий уровень накопления свинца и цинка в почках животных, у которых обнаружены очаговые изменения в органах. Сопоставление частоты встречаемости морфологических изменений в печени и почках и концентрации свинца и цинка в этих органах позволило сделать вывод о значимости изменений в указанных органах. Практический смысл полученных результатов, с одной стороны, затрагивает проблему идентификации опасных факторов и их влияния на функцию печени и почек, с другой стороны, заключается в применении показателя накопления свинца и цинка для распознавания (прогнозирования) структурных изменений в органах.

#### **4.5. Функциональное состояние и морфология органов детоксификации и выведения в зависимости от токсиканта**

Одной из основных мишеней токсического действия свинца являются почки. На втором месте обычно упоминается нервная система [Переслегина, И. А., 2006]. Достаточно хорошо исследовано его негативное влияние на структуру костной ткани, в которой этот металл замещает кальций, что является одной из причин развития остеопороза. В эксперименте в печени обнаруживали столь же достоверное повышение концентрации свинца, что и

в почках ( $p < 0,001$ ). Эти данные о содержании свинца в органах и тканях коррелируют с содержанием свинца в крови, которая распределяет токсикант по организму. Содержание свинца в крови является одним из показателей, по которому ставится диагноз соответствующего токсического действия.

Одним из основных условий влияния эссенциальных и/или токсичных микроэлементов на ту или иную функцию организма является их значимое накопление в органе–мишени. Концентрация цинка в печени, почке экспериментальных животных в целом была выше, чем в головном мозге, а также в других внутренних органах. Это лишний раз подтверждает сведения о выраженном преимущественном депонировании цинка в печени, почках.

Иная картина наблюдалась в отношении накопления свинца в разных органах крыс. Этот токсичный микроэлемент в селезенке, печени, почках накапливался в большей степени, чем в других органах и тканях.

Таким образом, наиболее значимым результатом данного эксперимента явилось установление факта существенного накопления токсичного микроэлемента - свинца - в печени, почках, селезенке и эссенциального микроэлемента цинка – в печени, почках.

В условиях проведенного эксперимента существенным изменениям подверглась структурная реорганизация печени и почек. Результаты проведенного экспериментального исследования свидетельствуют о существенном влиянии алиментарного поступления всех изучаемых химических элементов как на базовые морфологические признаки печени и почек, так и на их функции.

В почечных тельцах нефронов происходит первая фаза образования — фильтрация, результате чего образуется первичная моча (более 100 л в сутки). В канальцах нефронов и в собирательных трубочках протекает вторая фаза мочеобразования, т. е. реабсорбция, следствием чего является качественное и количественное изменение мочи. Из нее полностью исчезают сахар и белок, заключительная (третья) секреторная фаза мочеобразования

осуществляется в канальцах нефронов и собирательных трубочках, где реакция мочи становится слабокислой [Афанасьев Ю.И. и др., 2012].

Эпителий проксимальных канальцев — основное место транспорта натрия. Нарушение процессов реабсорбции его приводит к усиленному поступлению натрия в область *macula densa* и стимулирует продукцию ренина, который вызывает и поддерживает спазм приводящих артериол с перераспределением почечного кровотока и запустеванием сосудов коры. Аfferентная вазоконстрикция сопровождается снижением интракапиллярного давления в гломерулярных капиллярах, чем можно объяснить снижение клубочковой фильтрации, характерное для острой почечной недостаточности, и транскапиллярного транспорта растворов [Тареева И. Е., 2000].

Таким образом, наблюдаемое в почках увеличение диаметра канальцев можно рассматривать как адаптивную реакцию — компенсацию уменьшенной фильтрации в клубочках.

Гипертрофия почечных телец, наблюдаемая при воздействии цинка, является компенсаторной функцией, обеспечивающей нормализацию работы органа.

Проведенные нами исследования указывают на важную роль структурно-функциональных изменений в печени и почках при алиментарном избытке свинца и цинка.

Полученные морфометрические расчеты показали, что увеличение объема ядра и изменение объема цитоплазмы отражают выраженность дистрофических изменений в печени.

Учитывая вышеизложенное, в качестве структурно-функциональных мишеней действия свинца и цинка в почке были выбраны именно эти структурные единицы.

**Факторы формирования функции и структуры печени и почек в экспериментальных моделях на лабораторных животных**

Установление факторной структуры переменных, характеризующих параметры реакции организма лабораторных животных в экспериментальных моделях токсического воздействия свинца и цинка, было нацелено как на выявление доминирующих взаимосвязей (поиск ведущих факторов), так и на подтверждение описанных ранее закономерностей.

В предыдущих работах идентифицировано три значимых фактора (объединения признаков), объясняющих более 25% общего варьирования анализируемых переменных: базовый структурно-функциональный; «токсический», «функциональный». Наиболее значимым объединением признаков оказался структурно-функциональный фактор [Барышева Е.С., 2008].

Экспериментальные подтверждения неравномерного распределения элементов в организме позволяют сделать вывод, что токсическое действие неорганических соединений на разных структурных уровнях проявляется также неравномерно. Структуры, в которых накопление элементов максимально, как правило, претерпевают наибольшие аномальные изменения, что подтверждается результатами эксперимента.

При изучении комбинированного влияния тяжелых металлов на экспериментальных животных установлено, что в основе дистрофических процессов лежат нарушения микроциркуляции, а их степень зависит от концентрации металлов в крови.

#### **4.6. Экспрессия металлотионеина-1 в органах крысы при интоксикации цинком и свинцом**

Внутриклеточное распределение металлотионеина-1 биохимическими методами показало, что это в основном цитоплазматический белок. Иммуногистохимическое определение локализации этого белка может быть затруднено из-за его плохой антигенности [Banerjee, D., 1982].

Оценивая возможность выявления экспрессии МТ-1 в структурных элементах органов в качестве маркера воздействия металлов, мы исходили из того, что у контрольных крыс МТ-1 преимущественно был локализован в цитоплазме гепатоцитов, собирательных трубочках и дистальных извитых канальцах почечного эпителия [Banerjee, D., 1982].

Анализ уже имеющихся сведений о роли МТ позволяет полагать, что повышенное содержание МТ может быть достаточно информативным дополнительным тестом или биомаркером воздействия токсичных металлов при диагностике металлотоксикозов или отравлений.

Изучение индукции синтеза МТ свидетельствует о низком риске развития тубулярной протеинемии у людей с высокой экспрессией МТ, и, напротив, при слабой эффективности индуктивного синтеза (или низкого исходного пула МТ) может быть повышена чувствительность даже к низким дозам токсичных металлов.

Выполнение многообразных функций МТ зависит от их компартментализации или внутриклеточного распределения, а также тканевой экспрессии этих белков. В нормальной печени МТ экспрессируются, главным образом, в паренхиматозных клетках, окружающих сосуды портальной системы. В почках максимальная экспрессия МТ определяется в тубулярных клетках коры. Локальность синтеза МТ зависит от степеней экспозиции разными ксенобиотиками. Предполагают, что мозаичность экспрессии МТ в печени, эндотелии, эпителии (клетки Панета в тонкой кишке) и других органах и тканях связана с вкладом МТ в регуляцию дифференцировки различных тканевых элементов и реализацию регенераторных свойств тканей [Кудрин А.В., 1998].

В экспериментальных исследованиях отмечено, что снижение концентраций отдельных металлов в крови может не сопровождаться снижением токсических эффектов. Этот факт представляется контраргументом для использования уровней концентраций тяжелых металлов в качестве единственных биомаркеров металлотоксикозов или

отравлений. Результаты могут служить основой дальнейшего мониторинга металлотioneинов в крови людей как одного из биомаркеров воздействия тяжелых металлов [Елаева Н.Л., 2013]

Соединения цинка и свинца, вызывая при внутрибрюшинном введении различные морфологические изменения в органах крыс, являются индукторами МТ, что подтверждается различиями в экспрессии МТ после введения растворов металлов. Свинец вызывает необратимые морфологические изменения в селезенке, головном мозге, препятствуя экспрессии МТ в этих органах. Выраженная экспрессия МТ при однократном остром воздействии свинца является тканеспецифичной, наибольшей – в печени, почке. При воздействии соединений цинка наблюдалась слабая, диффузная экспрессия МТ в нейронах, глиальных клетках и эндотелиоцитах головного мозга. Данный факт может свидетельствовать об активации механизмов защитных реакций с участием металлотioneина при слабом токсическом воздействии цинка, способствуя поддержанию морфологической целостности головного мозга. Проведенное иммуногистохимическое исследование позволило локализовать, дифференцировать и установить количественные характеристики различных функциональных отделов органов и тканей, что может быть использовано в экспертной практике при диагностике патологических процессов.

При анализе структуры, экспрессии, распределения, регулирования, функций, механизма действия МТ-I/II в восстановлении после черепно-мозговой травмы авторы видят перспективы приложения результатов исследования в области судебной медицины (поражение головного мозга наркотическими средствами, давность образования черепно-мозговой травмы) [Li D., 2014].

Получение информации об экспрессии МТ -1 позволяет решать широкий круг задач, в т.ч. изучение патогенеза и прогнозирования эффективности терапии при онкологических заболеваниях [Шафран, Л. М., 2011].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Адекватная оценка воздействия свинца и цинка является неотъемлемой частью корректной оценки риска этих элементов для здоровья и жизни человека и должна предусматривать комплекс исследований, в котором одно из приоритетных мест занимают инструментальные аналитические исследования, позволяющие получить наиболее точные количественные характеристики об аккумуляции элементов в органах и тканях.

Особое значение в настоящее время имеет методическое обеспечение, основанное на использовании чувствительного аналитического оборудования, которое отвечает требованиям унификации и стандартизации методов исследования.

Распространенность свинца и цинка в объектах окружающей среды и их высокая токсичность обуславливают необходимость разработки надежного и всесторонне информативного комплекса токсического воздействия этих элементов на организм человека. Ранее утвержденные в РФ и действующие в судебно-химической практике методики определения концентрации свинца и цинка, пробоотбора объектов характеризуются недостаточной селективностью, имеют низкий предел обнаружения, не исключают потерь элементов при пробоподготовке, не учитывают индивидуальные особенности распределения элементов в организме, требуют значительных материальных затрат: расхода реактивов, рабочего времени. Для элементного анализа биологических объектов человека в настоящее время в РФ утверждена методика определения 38 элементов методом ICP-MS, погрешность которых составляет до 40% для нижнего диапазона определения. Метод имеет рекомендательный характер и не устанавливает точных условий каждого этапа, что затрудняет его использование в судебно-экспертных целях. В процессе проведения экспериментального исследования применена схема подготовки образцов, позволяющая минимизировать различные влияния, в т.ч. матричные.

Описанные условия эксперимента позволили установить достоверные различия уровней свинца и цинка в различных образцах при различных дозах воздействия на крыс.

Предлагаемый комплекс методов позволяет установить причинно-следственные связи и зависимости, возникающие при однократной экспозиции свинца и цинка, обосновать применение комплексного подхода к оценке токсического воздействия свинца и цинка при проведении судебно-химических исследований.

Сравнительная оценка концентраций свинца и цинка, морфологических изменений в почке и печени, наблюдаемых при остром воздействии элементов, уровня экспрессии маркера эффекта – металлотioneина-1 в различных органах крыс позволила предложить необходимый и достаточный алгоритм и набор методов оценки токсического воздействия свинца и цинка на организм.

В результате экспериментального моделирования при изучении воздействия неорганических соединений свинца и цинка на лабораторных животных установлено:

1. Комплексом проведенных исследований (химическое, гистологическое, иммуногистохимическое) установлено, что наиболее значительным патологическим изменениям при интоксикации животных соединением свинца подвержены почки и печень, наибольшее количество свинца обнаружено в селезенке.

2. При интоксикации экспериментальных животных соединением цинка наибольшая концентрация микроэлемента и наибольший прирост её обнаружены в печени, почке.

3. Проведёнными измерениями концентрации макроэлемента натрия в различных объектах при воздействии на организм соединений свинца, установлена корреляционная связь между интоксикацией свинцом и снижением содержания натрия в органах. Проведено исследование



распределения различных форм цинка и свинца в почке и печени, установлен их коэффициент распределения в клетках органов.

4. Проведенным гистологическим исследованием выявлены некоторые характерные признаки поражения структурных почек и печени при интоксикации соединениями свинца и цинка.

Для почки:

- воздействие соединений свинца вызывает статистически значимое уменьшение площади почечного тельца ( $p=0,01$ ) и сосудистого клубочка ( $p=0,01$ );

- соединения цинка вызывают статистически значимое увеличение площади почечного тельца ( $p=0,01$ ) и сосудистого клубочка ( $p=0,01$ );

- при воздействии соединений свинца и цинка значимо увеличивается площадь мочевого пространства ( $p=0,01$ );

- внутренний диаметр проксимальных канальцев не имеет достоверных отличий в контрольной и экспериментальной группах животных ( $p=0,6$ ), которым вводили ацетат свинца, одновременно наблюдается статистически значимое различие у животных экспериментальной группы, которым вводили ацетат цинка ( $p=0,01$ ), по сравнению с животными контрольной группы. Отмечается статистически достоверное увеличение высоты эпителия канальцев ( $p=0,01$ ).

Для печени:

- выявлено статистически значимое увеличение размера ядер «цинковой» группы по сравнению с животными контрольной группы ( $p=0,01$ ), статистически незначимое изменение площади ядер у животных «свинцовой» группы ( $p=0,9$ ). Вместе с тем, при сравнении средней площади гепатоцитов отмечается статистически значимое уменьшение размеров гепатоцитов «свинцовой» группы по сравнению с животными контрольной группы ( $p=0,01$ ) и статистически значимое увеличение этого показателя в «цинковой» группе ( $p=0,01$ );

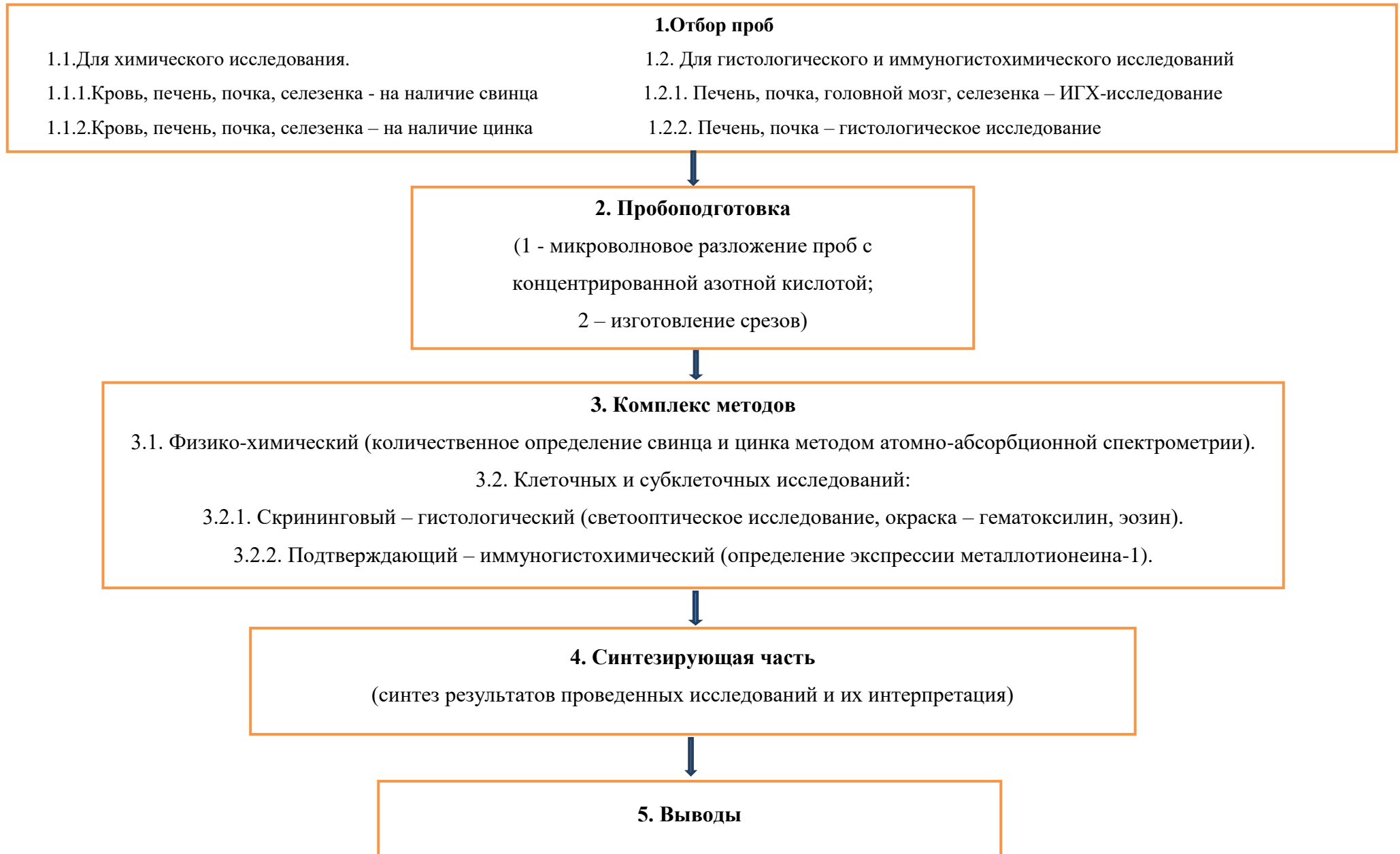
- характерно увеличение ядерно-цитоплазматического отношения (ЯЦО) при поступлении свинца и цинка ( $p=0,001$ ).

5. Установлено, что маркерами эффектов свинца и цинка в почке являются почечное тельце, мочевое пространство, сосудистый клубочек, проксимальные канальца; в печени – гепатоциты и их ядра.

6. Выявлена экспрессия металлотioneина-1 в тканях печени и почек при интраперитонеальном введении свинца и в тканях головного мозга при интраперитонеальном введении цинка (однократное введение этих соединений).

В целом, схему проведения комплексного исследования биологических объектов на наличие свинца и цинка можно представить как многоступенчатую, состоящую из нескольких стандартных операционных процедур – рисунок 36.

Рисунок 35 - Схема проведения комплексного исследования биологических объектов на наличие свинца и цинка



## ВЫВОДЫ

1. Однократное поступление цинка в диапазоне концентраций от 1 до 100 мг/кг вызывает у крыс его преимущественное накопление в печени ( $p < 0,001$ ), почке ( $p < 0,001$ ), селезенке ( $p = 0,05$ ), наименьшее – в головном мозге ( $p = 0,1$ ). Однократное поступление свинца в диапазоне концентраций от 1 до 100 мг/кг вызывает его преимущественное накопление в селезенке ( $p < 0,001$ ), печени ( $p < 0,001$ ), почке ( $p < 0,001$ ), наименьшее – в головном мозге ( $p < 0,001$ ) – при сравнении с данными контрольной группы.

2. В результате моделирования острых отравлений соединениями свинца и цинка выявлены характерные признаки поражения структурных почек и печени при введении высоких (субтоксических) доз.

3. Выраженная экспрессия металлотионеина-1 при остром воздействии свинца является тканеспецифичной, наибольшей – в печени, почке. При воздействии соединений цинка выявлена слабая, диффузная экспрессия металлотионеина-1 в нейронах, глиальных клетках и эндотелиоцитах головного мозга.

4. При экзогенном воздействии свинца в почках наблюдается уменьшение площади почечного тельца ( $p = 0,01$ ) и сосудистого клубочка ( $p = 0,01$ ). Соединения цинка вызывают увеличение почечного тельца ( $p = 0,01$ ) и сосудистого клубочка ( $p = 0,01$ ). Введение свинца и цинка вызывает увеличение площади мочевого пространства ( $p = 0,01$ ). Для соединений цинка и свинца характерно увеличение наружного диаметра проксимальных канальцев почек ( $p = 0,05$ ). Отмечается увеличение высоты эпителия канальцев ( $p = 0,01$ ).

5. В печени выявлено увеличение площади ядер «цинковой» группы ( $p = 0,01$ ), «свинцовой» группы ( $p = 0,9$ ). Для печени характерно увеличение ядерно-цитоплазматического отношения при поступлении свинца и цинка ( $p = 0,001$ ). Площадь гепатоцитов при этом уменьшается при введении свинца ( $p = 0,01$ ) и увеличивается при введении цинка ( $p = 0,01$ ).

6. Теоретически обоснован, экспериментально проверен алгоритм эффективной комплексной судебно-химической оценки острого токсического действия свинца и цинка, включающий измерение концентрации свинца и цинка в биологических объектах методом атомно-абсорбционной спектрометрии, измерение морфометрических показателей почек и печени, протокол выявления экспрессии металлотioneина-1 иммуногистохимическим методом.

## НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При проведении судебно-химических исследований в случае острых отравлений соединениями свинца и цинка целесообразно применять комплекс методов, включающий физико-химический - измерение концентрации элементов в объектах атомно-абсорбционной спектрометрией; клеточный и субклеточный - обзорную микроскопию и определение морфометрических показателей печени и почки, иммуногистохимическое исследование экспрессии металлотионеина-1 в печени, почке, селезенке и головном мозге.

2. Выявленные особенности значимого накопления свинца и цинка в органах-мишенях при остром отравлении позволяют рекомендовать для измерения концентрации элементов кровь, печень, почку, селезенку.

3. При морфометрическом исследовании при острых отравлениях соединениями свинца и цинка в почке следует измерять наружный и внутренний диаметры проксимальных канальцев в корковом веществе, площадь почечных телец, мочевое пространство; в печени - площадь гепатоцитов и их ядер, ядерно-цитоплазматическое отношение (ЯЦО).

4. Полученная информация об экспрессии МТ-1 при острых отравлениях соединениями свинца и цинка позволяет решать широкий круг перспективных задач, в т.ч. изучение патогенеза и прогнозирования эффективности терапии при различных заболеваниях, связанных с изменением концентрации этих элементов в организме.

**СПИСОК ОСНОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ**

ААС – атомно-абсорбционная спектрометрия

АТФ – аденозинтрифосфат

ВОЗ – Всемирная Организация здравоохранения

ГСО – государственный стандартный образец

ИГХ – иммуногистохимическое исследование

ИСП – МС - масс-спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой

МКБ-10 - международная классификация болезней 10 пересмотра

МТ – металлотионеины

ПААС – пламенно-абсорбционная атомно-абсорбционная спектрометрия

ПОЛ – перекисное окисление липидов

ТВП - температурно-временная программа

ЭТААС – электротермическая атомно-абсорбционная спектрометрия

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Авцын, А. П. Ультраструктурные основы патологии клетки / А. П. Авцын, В. А. Шахламов – М. : Медицина, 1979. – 316 с.
2. Авцын, А. П. Микроэлементозы человека: этиология, классификация, органопатология / А.П. Авцын, А.А. Жаворонков, М.А. Риш, Л.С. Строчкова. - М. : Медицина, 1991. - 496 с.
3. Алемасова А. С., Рокун А. Н., Шевчук И. А. Аналитическая атомно-абсорбционная спектроскопия. Учебное пособие. – Донецк, 2003. - 327 с.
4. Андрусихина, И. Н. Сравнительная оценка спектральных методов определения макро – и микроэлементов в биосредах человека / И. Н. Андрусихина, Е. Г. Лампека, И. А. Голуб // Актуальные проблемы транспортной медицины. - № 4 (18). - 2009. - С. 75-83.
5. Арзамасцев, А. П., Фармацевтическая химия. М. : ГЭОТАР-МЕД, 2005. — 640 с.
6. Аруин, Л. И. Структурные основы адаптации и компенсации нарушенных функций : руководство / [Л. И. Аруин, А. Г. Бабаева, В. Б. Гельфанд и др.] : под ред. Д. С. Саркисова. – М. : Медицина, 1997. – 445 с.
7. Атчабаров, Б. А. Поражение нервной системы при свинцовой интоксикации / Б. А. Атчабаров. — Алма-Ата, Наука, 1966 – 487 с.
8. Ахметзянова Э. Х. Роль свинца в формировании артериальной гипертензии. // Медицина труда и промышленная экология, 2006, № 5, С. 17–22.
9. Барашков, Г. К. Использование законов межэлементных взаимодействий для понимания механизмов некоторых заболеваний человека / Г. К. Барашков, Л. И. Зайцева // Биомедицинская химия. – 2008. – т. 54, вып. 3. - С. 266-277.
10. Барышева, Е. С. Роль микроэлементов в функциональном и структурном гомеостазе щитовидной железы (клинико-экспериментальное исследование) : автореф. дис. ... д-ра мед. наук : 03.00.13 / Барышева Елена Сергеевна. – М., 2008. – С. 40.



11. Бейзель, Н. Ф. Атомно-абсорбционная спектрометрия: Учеб. пособие / Новосибир. гос. ун-т. Новосибирск, 2008. - 72 с.
12. Белова, А. В. Руководство к практическим занятиям по токсикологической химии / А. В. Белова. – М.: Медицина, 1976. – С. 55 – 117.
13. Бёккельман, И. Нейротоксические эффекты многолетней экспозиции свинцом / И. Бёккельман, Э. Пфистер // Медицина труда и промышленная экология. - 2001. - № 5. - С. 22-25.
14. Бингам, Ф. Т. Некоторые вопросы токсичности ионов металлов: Пер. с англ. / Под ред. Х. Зигеля, А. Зигель. - М. : Мир, 1993. -368 с.
15. Биохимия: Учебник. // Под ред. Северина Е. С. — М. : ГЭОТАР-МЕДИА, 2003. - 779 с.
16. Богомолов, Д. В. Примеры использования иммуногистохимических методов в судебной медицине. В кн.: Актуальные вопросы профилактики и лабораторной диагностики в судебной медицине. Сборник материалов расширенной научно-практической конференции, посвященной 95-летию СПб «Городское бюро судебно-медицинской экспертизы». СПб, 2013; 23-24 мая.
17. Боев, М. В. Сравнительная гигиеническая оценка биологических маркеров экспозиции и межсредового распределения микроэлементов в среде обитания : автореф. дис. ... канд. мед. наук : 14.00.07 / Боев Михаил Викторович. - Оренбург, 2008. 24 с.
18. Болезни почек / А. Пухлев, Г. Гылабов, Г. Митров и др.; под ред. Г. Маджракова, Н. Попова. – [4-е изд.]. – София : Медицина и физкультура, 1980. – 804 с.
19. Большаков, А.М. Влияние социально-экономических факторов на показатели здоровья населения / А.М. Большаков, Е.И. Акимова // Социально-гигиенические аспекты охраны здоровья населения: Материалы межрегиональной науч.-практ. конф. - Рязань, 1997. - С. 64-65.
20. Большов, М. А. Современные подходы к определению содержания примесных элементов в фармацевтических субстанциях методом масс-

спектрометрии с индуктивно связанной плазмой / М. А. Большов, И. Ф. Серегина, Е. В. Успенская и др. // Суд.-мед. экспертиза. – 2015. – Т. 58. - № 6. – С. 31 – 33.

21. Брицке, М. Э. Атомно-абсорбционный спектрохимический анализ (Методы аналитической химии) / М. Э. Брицке. - М. : Химия, 1982. - 224 с.

22. Вернадский, В. И. Об условиях проявления жизни на Земле / В. И. Вернадский. Избранное собр. сочинений, Т. V. – М. : Изд-во АН СССР. - 1960. – С. 147–159.

23. Владимцева, Т. М. Мутагенез и запрограммированная клеточная гибель при цитотоксическом воздействии хлорида цинка : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.00.16 - Красноярск, 2003. 24 с.

24. Волынский А. Б. Систематический подход к устранению матричных влияний в электротермической атомно-абсорбционной спектрометрии: автореф. дис. ... докт. хим. наук: 02.00.02 / Волынский Анатолий Борисович. – М., 2001. - 47 с.

25. Всемирная Организация Здравоохранения (ВОЗ). Информационный бюллетень № 379. - Сентябрь 2013 г.

26. Ганжара, П. С. Учебное пособие по клинической токсикологии / П. С. Ганжара, А. А. Новиков. – М. : Медицина, 1979, С. 292-301.

27. Гатагонова, Т. М. Функциональное состояние сердечно-сосудистой системы у рабочих, занятых в производстве свинца / Т. М. Гатагонова // Медицина труда и промышленная экология. – 1995. - № 1. – С. 15-21.

28. Гилева, О. В. Методическое обеспечение гигиенической оценки опасности воздействия ванадия на организм детей в зоне размещения металлургических производств феррованадиевых сплавов: дисс... канд. биол. наук: 14.02.01 / Гилева Ольга Владимировна. – М., 2014. – С. 233.

29. Гистология, эмбриология, цитология : учебник / Ю. И. Афанасьев, Н. А. Юрина, Е. Ф. Котовский и др.; под ред. Ю. И. Афанасьева, Н. А. Юриной. — 6-е изд., перераб. и доп. — М. : ГЭОТАР-Медиа, 2012. — 800 с.

30. Горшков, В. В. Концентрирование и атомно-абсорбционное определение кадмия и свинца в природных объектах / В. В. Горшков, Л. П. Орлова, М. А. Воронкова // Журнал аналит. Химии. – 1980. - т. 35. - С. 1277-1282.
31. ГОСТ 26929-94 "Сырье и продукты пищевые. Подготовка проб. Минерализация для определения содержания токсичных элементов" - Минск: Изд-во стандартов, 1995.
32. ГОСТ Р 53434-2009 Принципы надлежащей лабораторной практики. – М. : Стандартиформ, 2009. – 16 с.
33. Государственный доклад «О санитарно-эпидемиологической обстановке в Российской Федерации за 2012 год». – М. : 2013, С. 124.
34. Грацианская, Л.Н. Клиника профессиональных нейротоксикозов / Л. Н. Грацианская, Г. Э. Розенцвит – М. : Медицина, 1961. - 52 с.
35. Громова, О. А. Протективная роль церебролизин-индуцированной экспрессии генов металлотронеина-1 и металлотронеина-2 при церебральной очаговой ишемии у крыс / О. А. Громова, Н. Ю. Сотникова, С. И. Катаев и др. // Цитокины и воспаление. – 2005. - № 1. – С. 40-45.
36. Губский, Ю. И. Токсическая гибель клетки : свободорадикальное повреждение ДНК и апоптоз / Ю. И. Губский // Лікування та діагностика. – 2001. – № 4. – С. 8-13.
37. Гудзовский, Г. А. Некоторые особенности патологии сердечно-сосудистой системы, возникающей при действии соединений, содержащих свинец и медь / Гудзовский Г. А., Минаев Б.Д., Малыхин Ф.Т. и др. // Медицина труда.- 2004.- № 8.- С.32-36.
38. Дрогичина, Э. А. Профессиональные болезни нервной системы / Э. А. Дрогичина - М. : Медицина, 1968.- 120 с.
39. Другов, Ю. С. Анализ загрязненных биосред и пищевых продуктов : практическое руководство / Ю. С. Другов, А. А. Родин. — М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2007. — 294 с.
40. Зайчик, А. Ш. Основы патохимии. / А. Ш. Зайчик, Л. П. Чурилов. – 2-е изд. — СПб. : «ЭЛБИ-СПБ», 2001. - 687 с.

41. Елаева, Н. Л. Сравнительный анализ концентрации металлотиионеинов в плазме крови людей при использовании двух разных методов определения / Н.Л. Елаева, А.А. Иваненко, В.Л. Великова, В.А. Кашуро и др. // Токс. вестник. – 2013. - № 4. – С. 22-25.
42. Забокрицкий, М. П. Критерии выбора спектрального метода применительно к анализу микроэлементов в биологических объектах / М. П. Забокрицкий, В. В. Сабуров // Микроэлементы в медицине. – 2014. - 15(4). – С. 29–38.
43. Зайцева, Н. В. Методические подходы и критерии оценки при определении химических соединений в биосредах / Н. В. Зайцева, Т. В. Нурисламова, Т. Д. Карнажицкая, Г. Н. Суетина // Материалы Пленума Лабораторного Совета государственной санитарно-эпидемиологической службы РФ. – Москва. - 2004. - С. 59-64.
44. Зинина, О. Т. Влияние некоторых тяжелых металлов и микроэлементов на биохимические процессы в организме человека / О. Т. Зинина // Избранные вопросы судебной медицины и экспертной практики. Хабаровск. - 2001. - № 4. - С. 99-105.
45. Здольник, Т. Д. Оценка функции пищеварения у белых крыс при воздействии соединений цинка /Т. Д. Здольник, Е. А. Строев, В. Ф. Горбич // Гигиена и санитария. - 1997. - № 5. - С. 33 - 36.
46. Зербіно, Д. Д. Патоморфологія хронічної свинцевої нефропатії / Д. Д. Зербіно, Ю. О. Поспішил // Доклады Академии наук Украины. – 1994. – № 2. – С. 182-185.
47. Иваненко, Н .Б. Определение химических форм микроэлементов в биологических объектах / Н. Б Иваненко, Н. Д. Соловьев, А. А. Иваненко, Л. Н. Москвин // Аналитика и контроль. - 2012. - Т. 16. - № 2. – С. 108 – 133.
48. Иваненко, Н. Б. Определение Al, Be, Cd, Co, Cr, Mn, Ni, Pb, Se И Tl в цельной крови без предварительного разложения методом атомно-абсорбционной спектроскопии / Н. Б. Иваненко, А. А. Иваненко, Н. Д. Соловьев, Д. В.

Наволоцкий, О. В. Павлова, А. А. Гансеев // Биомедицинская химия, 2014. – т. 60, вып. 3. - с. 378 – 388.

49. Игнатова, Т. Н. Региональные биогеохимические особенности накопления химических элементов в зольном остатке организма человека / Т. Н. Игнатова, Н. В. Барановская, Л. П. Рихванов, А. Ф. Судыко // Изв. Томского политехнического университета. - 2010. - Т. 317, № 1. - С. 178–183.

50. Измеров, Н. Ф. Свинец и здоровье. Гигиенический и медико-биологический мониторинг / Н. Ф. Измеров. - М. : Наука, 2000. - 256 с.

51. Иммуногистохимические методы. Руководство. Под ред. Г. А. Франка, П. Г. Малькова. М. : Дако, 2011.

52. Калетина, Н. И. Ятрогенные и техногенные микроэлементозы: стратегия выживания (диагностические тест - системы, пути коррекции) / Н. И. Калетина, А. В. Скальный // 1-ая межд. конф. «Молекулярная медицина и биобезопасность». - М. - 2004.

53. Калетин, Г. И., Технология «Капиллярный электрофорез ИСП-МС» в метабономике / Г. И. Калетин, Н. И. Калетина, А. И. Брусиловский // Вестник ОГУ. – 2006. № 3. - С. 114-115.

54. Калетина, Н. И. Микроэлементы — биологические регуляторы / Н. И. Калетина, Г. И. Калетин // Наука в России, изд. РАН. М. : 2007 - № 1. - 78 с.

55. Кирик, О. В. Структурные изменения в эпителии канальцев почки крыс после слабого радиационного воздействия : Дис. ... канд. биол. наук : 03.00.25, 03.00.01 : СПб., 2004. 148 с.

56. Киселев, В. Б. Роль соединений ванадия, селена, свинца и ртути и методики их определения в минеральных водах / В. Б. Киселев, Л. А. Никулина, А. С. Быстрова // Вопр. курорт., физиотер. и лечеб. физ. культуры. - 1980. - № 1. - С. 59-62.

57. Ковалев, А. В. Иммуногистохимическое исследование структур проводящей системы сердца при смерти от алкогольной кардиомиопатии / А. В. Ковалев, Д. В. Богомоллов, Б. Н. Кульбицкий и др. // Суд.-мед. экспертиза. – 2015. – Т. 58. - № 2. – С. 30 -31.

58. Кольман, Я. Наглядная биохимия / Я. Кольман, К.-Г. Рем. - М. : Мир, 2000. - 469 с.
59. Кон, Р. М. Ранняя диагностика болезней обмена веществ / Р. М. Кон, К. С. Рот. — М. : Медицина, 1986. — 637 с.
60. Коржевский, Д. Э. Основы гистологической техники / Д. Э. Коржевский, А. В. Гиляров. – СПб. : СпецЛит, 2010. – 94 с.
61. Коржевский, Д. Э. Теоретические основы и практическое применение методов иммуногистохимии. Руководство. СПб. : СпецЛит, 2012. – 101 с.
62. Корбакова, А. И. Свинец и его действие на организм (обзор литературы) / А. И. Корбакова, Н. С. Сорокина, Н. Н. Молодкина и др. // Мед. труда. - 2001. - №5. - С. 29-34.
63. Крамаренко, В. Ф. Химико–токсикологический анализ / В. Ф. Крамаренко. – Киев : Вища школа, 1982. – С. 110 – 196.
64. Крылова, А. Н. Исследование биологического материала на «металлические» яды дробным методом / А. Н. Крылова. – М. : Медицина, 1975. – 100 с.
65. Кудрин, А. В. Иммунофармакология микроэлементов / А. В. Кудрин, А. В. Скальный, А. А. Жаворонков, М. Г. Скальная, О. А. Громова. – М. : КМК, 2000. – 537 с.
66. Кулинский, В. И. Лекционные таблицы по биохимии / В. И. Кулинский. - Иркутск : ИГМУ, 2004. - 110 с.
67. Курляндский, Б. А. Общая токсикология / под ред. Б. А. Курляндского, В. А. Филова. – М. : Медицина, 2002. - 608 с.
68. Лазарев, Н. В. Вредные вещества в промышленности. Справочник для химиков, инженеров и врачей. Изд. 7-е, пер. и доп. В трех томах. Том III. Неорганические и элементарорганические соединения / Под ред. Н. В. Лазарева, И. Д. Гадаскиной. - Л. : «Химия», 1977. - 608 с.
69. Ландриган, Ф. Современные проблемы эпидемиологии и токсикологии профессионального воздействия свинца / Ф. Ландриган // Гигиена труда. - 1991. - № 6. - С. 25-27.

70. Леонтьева, В. М. Надежность интерпретации количественного определения неорганических токсикантов в биологических объектах / В. М. Леонтьева, И. С. Лузанова, Ю. В. Зорин, Д. Ю. Светлолобов // Сборник тезисов конференции АСТЕ`2013. – М. : Изд. группа «Граница», 2013. – С. 52 – 53.

71. Литвицкий, П. Ф. Патопфизиология: в 2 т. / П. Ф. Литвицкий. — М. : ГЭОТАР - МЕДИА, 2002. - Т.2. - С. 38-44.

72. Лосев, В. Н. Сорбционно-атомно-абсорбционное и сорбционно-атомно-эмиссионное (с индуктивно связанной плазмой) определение металлов в природных водах с использованием силикагеля, химически модифицированного меркаптопропильными группами / В. Н. Лосев, Н.В. Мазняк, Е. В. Буйко, А. К. Трофимчук // Аналитика и контроль. – 2005, Т. 9. - № 1. - С. 81 – 85.

73. Лузанова, И. С. Разработка и оптимизация методик определения s-, p-, d-элементов в биоматериалах при химико-токсикологических и медико-криминалистических исследованиях : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 15.00.02, 14.00.20 / Лузанова Ирина Секргеевна. – М., 2008. – 27 с.

74. Мазняк, Н. В. Определение натрия и калия в биологических объектах методами атомно-абсорбционной и атомно-эмиссионной спектроскопии / Н. В. Мазняк, А. П. Верхотурова, В.Н. Лосев, Т.Н. Замай //Journal of Siberian Federal University. Chemistry. - 2012. - V. 5, № 3. - P.320-330 (a).

75. Мазняк, Н. В. Электротермическое атомно-абсорбционное определение содержания фосфора в водах различного генезиса и биологических материалах / Н. В. Мазняк, В. Н. Лосев, А. П. Верхотурова, В. А. Кутяков // Материалы Всероссийской конференции с международным участием по аналитической спектроскопии, Краснодар, 2012. - 220 С (б).

76. Макаренко, Т. Ф. Определение тяжелых металлов в некоторых органах, тканях и жидкостях человека в норме / Т. Ф. Макаренко, Т. В. Вознесенская, В. И. Меницкая // Суд. - мед. эксп. - 2001. - № 5. - С. 28-32.

77. Мартинчик, А. Н. Питание человека / А. Н. Мартинчик, И. В. Маев, А. Б Петухов. - М. : ГОУ ВУНМЦ МЗ РФ, 2002. - 572 с.

78. Маршалл, В. Дж. Клиническая биохимия / В. Дж. Маршалл. - М.-СПб. : «Изд-во БИНОМ»- «Невский диалект», 1999. — 367 с.
79. Методические рекомендации Минздрава СССР от 7 декабря 1990 г. № 5205-90. Биологический контроль производственного воздействия вредных веществ.
80. МИ 2336-2002: Показатели точности, правильности и прецизионности методик количественного химического анализа. Методы оценки. Екатеринбург : ФГУП УНИИМ, 2004. - 45 С.
81. Момчилович, Б. Многоэлементный анализ волос в раннем выявлении остеопороза и избытка тяжелых металлов в организме: преимущества динамического исследования перед одномоментным / Б. Момчилович, Дж.И. Ликкен // Микроэлементы в медицине. – 2005, 6 (4). – С. 37-42.
82. Морозова, А. П. Атомно-абсорбционное определение содержания свинца и цинка в тканях органов крыс / А. П. Морозова, В. А. Кутяков, Н. В. Мазняк, В. Н. Лосев // IX Международное Курнаковское совещание по физико-химическому анализу : Тез. докл. - Пермь, 2010. - С. 294.
83. Назаров, Г. Н. Методы спектрального анализа в судебной медицине / Г. Н. Назаров, Т. Ф. Макаренко. – М. : МНПП «ЭСИ», 1994. –360 с.
84. Нефрология: Руководство для врачей / Под ред. И. Е. Тареевой. — М.: Медицина, 2000. — 2-е изд., перераб. и доп. — С. 580-595.
85. Орлова А. М. Анализ публикаций по токсикологической (судебно) химии в журнале «Судебно-медицинская экспертиза» за период 2004-2013 г.г. Сообщение 2. Анализ и оценка публикаций, особенности развития исследований / А. М. Орлова // Суд.-мед. экспертиза. – 2016. – Т. 59. - № 1. – С. 52 – 59.
86. Павловская, В. В. Экологические аспекты реакции моллюсков *Dreissena Polymorpha* (Pallas, 1771) на действие ионов тяжелых металлов : дис. ... канд. биол. наук : 03.00.16 / Павловская Валерия Владимировна. - Калининград, 2007. - 402 с.
87. Переслегина, И. А. Биохимическая характеристика взаимосвязи между уровнем свинца в крови у детей и нарушениями функций центральной



нервной систем (в 2 ч.) / И. А. Переслегина, П. П. Загоскин // Нижегород мед. журнал, - 2006. - № 8. - С. 139-148.

88. Плахова, Л. В. Аналитические подходы атомно-абсорбционного определения ряда металлов в биологических средах / Л. В. Плахова, Н. Л. Вишневская // Геология, геофизика и разработка нефтяных и газовых месторождений. – 2010. - № 12. – С. 91 – 93.

89. Плотко, Э. Г. Токсикологическая оценка малых концентраций окиси свинца в атмосферном воздухе / Э. Г. Плотко, Т. С. Егорова, В. Г. Ленченко и др. // Гиг. и сан. – 1978. - № 6. - С. 96-98.

90. Погорелова, О. С. Структурно – метаболические изменения сердца крыс в норме и в условиях техногенных микроэлементозов // О. С. Погорелова // Морфология.- 2008. - Т. II, № 2. - С. 47-55.

91. Приказ Минздрава РФ от 27 мая 1997 г. № 170 «О переходе органов и учреждений здравоохранения РФ на международную статистическую классификацию болезней и проблем, связанных со здоровьем X пересмотра» (в ред. Приказа Минздрава России от 12 01 98 № 3).

92. Приказ Минздравсоцразвития России от 12.05.2010 г. № 346н «Об утверждении Порядка организации и производства судебно-медицинских экспертиз в государственных судебно-экспертных учреждениях Российской Федерации».

93. Приказ Минздравсоцразвития РФ от 23.08.2010 г. № 708н г. Москва «Об утверждении правил лабораторной диагностики».

94. Пыхтеева, Е. Г. Металлотионеин: биологические функции. Роль металлотионеина в транспорте металлов в организме / Е. Г. Пыхтеева // Актуальные проблемы транспортной медицины. – 2009. - № 4 (18). - С. 44-59.

95. Свинец: МРПТХВ. Под ред. Н. Ф. Измерова. - М. : ЦМП ГКНТ, 1984. - 36 с.

96. Скальный, А. В. Методы исследования элементного состава организма: теоретические и прикладные аспекты / А.В. Скальный, М.Г. Скальная,

Е.В. Лакарова, Ю.В. Ломакин, К.О. Шарипов // Микроэлементы в медицине. – 2012. - 13(3). – С. 14–18.

97. Снакин, В. В. Загрязнение биосферы свинцом: масштабы и перспективы для России / В. В. Снакин // Медицина труда и промышленная экология. - 1999. - № 5. - С. 23.

98. Соловьев, Н. Д. Прямое определение бериллия, кадмия, ртути, свинца и таллия в цельной крови методом зеемановской модуляционной поляризационной спектроскопии: автореф. дисс... канд. хим. наук: 02.00.02 / Соловьев Николай Дмитриевич. – СПб., 2012. – С. 19.

99. Стойкова, Е. Е. Анализ следовых количеств веществ / Е. Е. Стойкова, А. В. Порфирьева, Г. А. Евтюгин. – Казань : Казанский Приволжский федеральный университет им. В.И. Ульянова-Ленина, 2010.- 72 с.

100. Столяров, И. Д. Коррекция миелопидом иммунодефицита у сотрудников промышленного предприятия, работающих со свинецсодержащими материалами / И. Д. Столяров, Р. П. Огурцов, М.В. Вотинцева и др. // Медицина труда и промышленная экология. - 1998. - №12. - С. 18-24.

101. Столярова, И. А. Атомно-абсорбционная спектроскопия при анализе минерального сырья / И. А. Столярова, М.П. Филатова. - Л. : Недра, 1981. –152 С.

102. Тиунов, Л. А. Метгемоглобинообразование при хронической интоксикации свинцом / Л. А. Тиунов, В. В. Кустов, Л. А. Линючева и др. // Гиг. и сан. – 1981. - № 8. - С. 75-76.

103. Тиц, Н. У. Энциклопедия клинических лабораторных тестов / Н. У. Тиц. - М. : Лабинформ, 1997. – 960 с.

104. Ткачук, В. А. Клиническая биохимия / В.А. Ткачук. - 2-е изд., испр. и доп. – М. : Медицина, 2004. – 515 с.

105. Токсикологическая химия. Аналитическая токсикология : учебник / под ред. Р. У Хабриева, Н.И. Калетиной. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 752 с.

106. Торчинский, Ю. М. Сера в белках / Ю. М. Торчинский. - М. : Медицина, 1977. - 124 с.

107. Трахтенберг, И. М. Свинец и окислительный стресс: экологический и производственный аспекты / И. М. Трахтенберг, Н. А. Утко, Т. К. Короленко и др. // Современ. проблемы токсикологии. – 2001. – № 4. – С. 50-53.

108. Трахтенберг, И. М. Влияние свинца на развитие окислительного стресса / И. М. Трахтенберг, Н. А. Утко, Т. К. Короленко и др. // Токсикологический вестник. – 2002. – № 3. – С. 22-26.

109. Уайт, А. Основы биохимии: В 3-х томах / А. Уайт, Ф. Хендлер, Э. Смит, Р. Хилл, И. Леман. — М. : Мир, 1981. — 1878 с.

110. Цыганенко, А. Я. Клиническая биохимия / А. Я. Цыганенко, В. И. Жуков, В. В. Мясоедов, И. В. Завгородний. — М. : «Триада-Х», 2002. - С. 300-310.

111. Шафран, Л. М. Токсикология металлов в решении задач охраны здоровья населения и окружающей среды / Л. М. Шафран, Е. Г. Пыхтеева, Д. В. Большой // Ж. Причерноморский экологичний бюллетень. - 2003. – № 1 (7) – С. 93-100.

112. Шафран, Л. М. Роль лизосом в механизме защиты и повреждения клеток при действии тяжелых металлов / Л. М. Шафран, Д. В. Большой, Е. Г. Пыхтеева и др. // Современные проблемы токсикологии. – 2004. – № 3. – С. 17-24.

113. Шафран, Л. М. Роль металлотионеина в развитии токсических нефропатий / Л. М. Шафран, Е. Г. Пыхтеева, Д. В. Большой // Актуальные проблемы транспортной медицины. - 2006. - № 2 (4). - С. 76-80.

114. Шафран, Л. М. Металлотионеин как биомаркер в эксперименте и клинике / Л. М. Шафран, Е. Г. Пыхтеева, Д. В. Большой // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2011. - № 9. – С. 60-65.

115. Швайкова, М. Д. Токсикологическая химия / М.Д. Швайкова. – М. : Медицина, 1975. – С. 133 – 241.

116. Явербаум, П. М. Общие вопросы токсического действия свинца / П. М. Явербаум. — Иркутск, 2006. — 344 с.

117. Adonaylo, V. N. Lead intoxication: antioxidant defenses and oxidative damage in rat brain / V. N. Adonaylo, P. I. Oteiza // *Toxicology*. -- 1999. - Vol. 135. - № 2-3. - P. 77-85.

118. Al Bakheet, Saleh A. Effect of long-term human exposure to environmental heavy metals on the expression of detoxification and DNA repair genes / Saleh A. Al Bakheet, Ibraheem M. Attafi, Zaid H. Maayah, Adel R. Abd-Allah, Yousif A. Asiri, Hesham M. Korashy // *Environmental Pollution*. – 2013. – V. 181. – P. 226-232.

119. Allan, R. E. Determination of zinc in food, urine, air, and dust by atomic absorption / R. E. Allan, J. O. Pierse, D. Yeager // *Am. Ind. Hyg. Asso. J.* -1968. –V. 29. P. 469-473.

120. Allen, J. G. Zinc toxicity in ruminants / J. G. Allen, H. G. Masters, R. L. Peet, et al. // *J. Comp. Pathol.* - 1983. – V. 93. – P. 363-377.

121. Alvarado, J. Determination of cadmium, chromium, copper, lead and zinc in human semen by graphite-furnace atomic absorption spectrometry after microwave sample dissolution / J. Alvarado, R. Moreno, A. R. Cristiano // *J. Trace Elem. Electrolytes Health. Dis.* - 1991. – Vol. 5(3). – P. 173-180.

122. Annabi, Berrahal A. Antioxidant enzymes activities and bilirubin level in adult rat treated with lead / A. Annabi Berrahal, A. Nehdi, N. Hajjaji, et al. // *C. R. Biol.* - 2007. - Vol. 330. - P. 581-588.

123. Ansari, M. S. Effects of high but nontoxic dietary zinc on zinc metabolism and adaptations in rats / M. S. Ansari, W. J. Miller, J. W. Lassiter, et al. // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* – 1975. – V. 150. – P. 534-536.

124. Apostoli, P. Critical aspects of male fertility in the assessment of exposure to lead / P. Apostoli, S. Porru, L. Bisanti // *Scand. J. Work. Environ. Health*. – 1999. – Vol. 25. – P. 40-43.

125. Arnaud, J. Determination of zinc in human milk by electrothermal atomic absorption spectrometry / J. Arnaud, A. Favier, J. Alary // *J. Anal. Atom. Spectrom.* - 1991. – Vol. 6(8). - P. 647-652.

126. Aslam, N. Mechanism of zinc uptake by microvilli isolated from human term placenta / N. Aslam, H. J. McArdle. // *J. Cell. Physiol.* – 1992. – V. 151(3). – P. 533-538.

127. Aughey, E. The effects of oral zinc supplementation in the mouse / E. Aughey, L. Grant, B. L. Furman, et al. // *J. Comp. Pathol.* - 1977. – V. 87. – P. 1-14.

128. Bandhu H.K, Dani V, Garg ML, and Dhawan DK, Hepatoprotective role of zinc in lead-treated, protein-deficient rats. *Drug Chem Toxicol*, January 1, 2006; 29(1): 11-24.

129. Banerjee, D. Immunohistochemical localization of metallothionein in cell nucleus and cytoplasm of rat liver and kidney / D. Banerjee, S. Onosaka, M. G. Cherian // *Toxicology.* – 1982, Vol. 24. - P. 95—105.

130. Barany, E. Relationships between trace element concentrations in human blood and serum / E. Barany, I. A. Bergdahl, L. E. Bratteby [et al.] // *Toxicological Letters.* – 2002. – V. 134. – P. 177–184.

131. Beaver, D. L. The ultrastructure of the kidney in lead intoxication with particular reference to intranuclear inclusions / D. L. Beaver // *Am. J. Pathol.* – 1961. – Vol. 39. – № 2. – P. 195-208.

132. Beer, W. H. Human placental transfer of zinc: Normal characteristics and role of ethanol / W. H. Beer, R. F. Johnson, M. N. Guentzel, et al. // *Alcoholism: Clinical and Experimental Research.* - 1992. – V. 16(1). – P. 98-105.

133. Bechara, E. F. Oxidative stress in acute intermittent porphyria and lead poisoning may be triggered by 5-aminolevulinic acid / E. F. Bechara // *Braz. J. Med. Biol. Res.* - 1996. - Vol. 29. - P. 841-851.

134. Bentley, P. J. Experimental dietary hyperzincemia tissue disposition of excess zinc in rabbits / P. J. Bentley, B. R. Grubb // *Trace Elements in Medicine.* - 1991. – V. 8. – P. 202-207.

135. Black, M. R. Zinc supplements and serum lipids in young adult white males / M. R. Black, D. M. Medeiros, E. Brunett, et al. // *Am. J. Clin. Nutr.* - 1988. – V. 47. – P. 970-975.

136. Blanc, P. An experimental human model of metal fume fever / P. Blanc, H. Wong, M.S. Bernstein, et al. // *Ann. Intern. Med.* - 1991. - V.114. – P. 930-936.
137. Blindauer, C. A. Metallothioneins with unusual residues: histidines as modulators of zinc affinity and reactivity / C. A. Blindauer // *J. Inorg. Biochem.* - 2008. – Vol. 102 (3). – P. 507-521.
138. Boergmann, U. Metal specification and toxicity of free metal ions to aquatic biota. In *Aquatic Toxicology*, ed. J.O. Nriagu. - New York. – Wiley and Sons. - 1983, P. 73.
139. Bolin, C. M. Exposure to lead and the developmental origin of oxidative DNA damage in the aging brain / C. M. Bolin, R. Basha, D. Cox et al. // *FASEB J.* - 2006. - Vol. 20(6). – P. 788-790.
140. Bracken, W. M. Induction of metallothionein in rat primary hepatocyte cultures: evidence for direct and indirect induction / W. M. Bracken, C. D. Klaassen // *J. Toxicol. Environ. Health.* – 1987. - № 22 (2). - P.163-174.
141. Bressler, J. Molecular mechanisms of lead neurotoxicity / J. Bressler, K. A. Kim, T. Chakraborti, G. Goldstein // *Neurochem. Res.* - 1999. - Vol. 24. - P. 595-600.
142. Brown, J. J. Zinc fume fever / J. J. Brown // *Br. J. Radiol.* - 1988. – V. 61. – P. 327-329.
143. Buchthal, F. Electrophysiology and nerve biopsy in men exposed to lead / F. Buchthal, F. Behse // *Br. J. Ind. Med.* – 1979. – Vol. 36 (2). – P. 135-47.
144. Carpena, E. Metallothionein functions and structural characteristics / E. Carpena, G. Andreani, G. Isani // *J. of Trace Elements in Medicine and Biology.* – 2007. – Vol. 21 S1. – P. 35–39.
145. Castellino, N. Kinetics of the distribution and excretion of lead in the rat / N. Castellino, S. Aloj // *Br. J. Industr. Med.* – 1964. – Vol. 21. – P. 308–314.
146. Chandra, R. K. Excessive intake of zinc impairs immune responses / R. K. Chandra // *JAMA.* - 1984. – V. 252. – P. 1443-1446.
147. Chang, W. Effects of Brn-3a protein and RNA expression in rat brain following low-level lead exposure during development on spatial learning and memory / W. Chang, J. Chen et al. // *Toxicol. Lett.* – 2006. – Vol. 164 (1). - P.63-70.

148. Chen, J. Effects of lead on the *Brn-3a* expression and the apoptosis in hippocampus neurons / J. Chen, W. Zhu et al. // *Wei Sheng Yan Jiu.* – 2004. – Vol. 33 (2). – P.134-139.
149. Chobanian, S. J. Accidental ingestion of liquid zinc chloride: Local and systemic effects / S. J. Chobanian // *Ann. Emerg. Med.* - 1981. – V. 10. – P. 91-93.
150. Choi, D. W. Zinc and brain injury / Choi D. W., Koh J. Y. // *Annu. Rev. Neurosci.* – 1998. - № 21. - C. 347-375.
151. Conga, W. Metallothionein prevents cardiac pathological changes in diabetes by modulating nitration and inactivation of cardiac ATP synthase / Weitao Conga, Ting Zhaoa, Zhongxin Zhua, Binbin Huang, et al. // *Journal of Nutritional Biochemistry.* - 2014. – V. 25. – P. 463–474.
152. Cooper, G. P. Effects of cadmium and lead on adrenergic neuromuscular transmission in the rabbit / G. P. Cooper, D. Steinberg // *Am. J. Physiol.* – 1977. – Vol. 232. - P. 128-131.
153. Cousins, R. J. Metallothionein--aspects related to copper and zinc metabolism / R. J. Cousins // *J. Inherit. Metab. Dis.* – 1983. – Vol. 6, Suppl. 1. – P. 15-21.
154. Danielson, K. G. Immunochemical localization of metallothionein in rat liver and kidney / K. G. Danielson, S. Ohi, P. C. Huang // *J. Histochem. Cytochem.* – 1982. – Vol. 30(10). – P. 1033-1039.
155. Davies, N. T. The effects of phytate on intestinal absorption and secretion of zinc, and whole body retention of Zn, copper, iron and manganese in rats / N. T. Davies, R. Nightingale – *Br. J. Nutr.* - 1975. V. 34. – P. 243-258.
156. Drinker, P. Metal fume fever: IV. Threshold doses of zinc oxide, preventive measures, and the chronic effects of repeated exposures / P. Drinker, R. M. Thomson, J. L. Finn // *J. Ind. Hyg.* - 1927. - V. 9. – P. 331-345.
157. Egli, D. The four members of the *Drosophila* metallothionein family exhibit distinct yet overlapping roles in heavy metals homeostasis and detoxification / D. Egli, J. Domenach, A. Selvaraj, K. Balamurugan et al. // *Genes. Cell.* -2006. – N 11. – P. 647–58.

158. Eichhorn, G. L. *Ecological Toxicity Research* / G. L. Eichhorn. - New York : Plenum Press, 1974. - P. 123.
159. Elinder, C. G. Zinc. In: Friberg L., Nordberg F.F., Vouk V., Eds. *Handbook on the toxicology of metals. Vol. II.* New York: Elsevier Science Publishers B.V., 1986. – P. 664-679.
160. Ercal, N. Toxic metals and oxidative stress. Part 1. Mechanisms involved in metal-induced oxidative damage / N. Ercal, H. Gurer-Orhan, N. Aykin-Burns // *Curr. Top. Med. Chem.* - 2001. - Vol. 1. - P. 529-539.
161. Fan, J. Determination of zinc in bloodstain by atomic-absorption spectrometry / J. Fan, C. Luo, S. Wang // *Atomic Spectroscopy.* - 1991. – Vol. 12(6). – P. 212-214.
162. Failla, M. L. Zinc uptake by isolated rat liver parenchymal cells / M. L. Failla, R. J. Cousins // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1978. – V. 538(3). – P. 435–444.
163. Fischer, P. W. F. The effect of dietary copper and zinc on cholesterol metabolism / P. W. F. Fischer, A. Giroux, B. Belonje, et al. // *Am. J. Clin. Nutr.* - 1980. – V. 33. – P. 1019-1025.
164. Flora, G. Toxicity of lead: A review with recent updates / G. Flora, D. Gupta, A. Tiwari // *Interdiscip. Toxicol.* - 2012. - Vol. 5. - P. 47-58.
165. Folin, M. Quantitative determination of copper and zinc in biological samples (human hair): Comparison between atomic-absorption spectrometry and X-ray fluorescence spectrometry / M. Folin, E. Cotiero, I. Calliari // *Ann. Chim. (Rome).* – 1991. – V. 81(1-2). – P. 39-49.
166. Formigari, A. Zinc, antioxidant systems and metallothionein in metal mediated-apoptosis: biochemical and cytochemical aspects / A. Formigari, P. Irato, A. Santon // *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* – 2007. – Vol. 146(4). – P. 443-59.
167. Forssen, A. Inorganic elements in the human body: I. Occurrence of Ba, Br, Ca, Cd, Cs, Cu, K, Mn, Ni, Sn, Sr, Y, and Zn in the human body / A. Forssen // *Ann. Med. Exp. Biol. Fenn.* - 1972. – V. 50. – P. 99-162.



168. Fowler, B. A. Effects of lead on the kidney: roles of high-affinity lead-binding proteins / B. A. Fowler, G. DuVal // *Environ. Health Perspect.* – 1991. – V. 91. – P. 77–80.
169. Fox, D. A. Persistent visual cortex excitability alterations produced by neonatal lead exposure / D. A. Fox, J. P. Lewkowski, G. P. Cooper // *Neurobehav. Toxicol.* – 1979. - P. 101–106.
170. Garvey, J. S. Detection of circulating metallothionein in rats injected with zinc or cadmium / J. S. Garvey, C. C. Chang // *Science.* - 1981. Vol. 214. – P. 805-807.
171. Garza, A. Cellular mechanisms of lead neurotoxicity / A. Garza, R. Vega, E. Soto // *Med. Sci. Monit.* – 2006. – V. 3. – P. 57-65.
172. George, S. G. *Physiological Mechanisms of Marine Pollutant Toxicity* / S. G. George. - New York : Academic Press, 1982. - P. 3.
173. Gil, F. Biomarkers as Biological Indicators of Xenobiotic Exposure / F. Gil, A. Pla // *J. Appl. Toxicol.* – 2001. – V. 21. P. 245–255.
174. Giroux, E.L. A study of zinc distribution in human serum / E. L Giroux, M. Dureux, P. Schechner // *Bio. Inorg. Chem.* – 1976. - V. 5. – P. 211-215.
175. Golimowsky, J. A Rapid High Performance Simultaneous Voltammetric Determination of Toxic Trace Metals in Urine / J. Golimowsky, P. Valenta, M. Stoeppler et al. // *Talanta.* - 1979. - Vol. 26. - P. 649-656.
176. Gordon, E. F. Zinc metabolism: Basic, clinical, and behavioral aspects / E. F. Gordon, R. C. Gordon, D. B. Passal // *J. Pediatr.* - 1981. – V. 99. – P. 341-349.
177. Gourlaouen, C. Is an Electronic Shield at the Molecular Origin of Lead Poisoning? A Computational Modeling Experiment / C. Gourlaouen, O. Parisel // *Angewandte Chemie Intern. Ed.* – 2007. – Vol. 46. – P. 553.
178. Gunther T, Gossrau R, Vormann J, et al. 1991. Protection against salicylate-induced hepatic injury by zinc: A histochemical and biochemical study. *Histochem J* 23(2):75-82.
179. Hallen, I. P. Lead and cadmium levels in human milk and blood / I. P. Hallen, L. Yorhem, B. J. Lagerkvist, A. Oskarsson // *Sci. Total Environ.* – 1995. – Vol. 166. № 1. – P. 149-155.

180. Hamdi, E. A. Chronic exposure to zinc of furnace operators in a brass foundry / E. A. Hamdi // *Br. J. Ind. Med.* - 1969. V. 26. – P. 126-134.
181. Hamilton, D. L. Zinc, cadmium, and iron interactions during intestinal absorption in iron-deficient mice / D. L. Hamilton, J. E. C. Bellamy, J. D. Valberg, et al. // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* - 1978. – V. 56. – P. 384-389.
182. Harford, C. Induction of metallothionein by simultaneous administration of cadmium(II) and zinc(II) / C. Harford, B. Sarkar // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* // 1991. – V. 177(1). P. 224-228.
183. Hayashi, M. Cadmium, lead, and zinc concentrations in human fingernails / M. Hayashi, K. Yamamoto, M. Yoshimura, et al. // *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* - 1993. – V. 50(4). – P. 547-553.
184. Hempe, J. M. Cysteine-rich intestinal protein and intestinal metallothionein: An inverse relationship as a conceptual model for zinc absorption in rats / J. M. Hempe, R. J. Cousins // *J. Nutr.* - 1992. - V. 122(1). – P. 89-95.
185. Hijova E., *Bratisl Lek Listy.* 2004; 105(5-6):230-4. Metallothioneins and zinc: their functions and interactions.
186. Hook, J. B. Toxicology of kidney / J. B. Hook, R. S. Goldstein. - 2-nd ed. – N- York : Raven Press, 1993. - P. 441.
187. Hooper, P. L, Zinc lowers high-density lipoprotein-cholesterol levels / P. L. Hooper, L. Visconti, P. J. Garry, et al. // *JAMA.* - 1980. – V. 244. – P. 1960-1961.
188. Hozumi, I. Metallothionein-3 is expressed in the brain and various peripheral organs of the rat / I. Hozumi, J.S. Suzuki, H. Kanazawa, A. Hara, et al. // *J. Neurosci. Lett.* – 2008. – Vol. 438. – P. 54-58.
189. Kagi, J. H. Metallothionein: a cadmium- and zinc-containing protein from equine renal cortex. / J. H. Kagi, B. L. Valee // *J. Biol. Chem.* - 1960. – Vol. 235. – P. 3460–3465.
190. Karrari, P. A systematic review on status of lead pollution and toxicity in Iran; Guidance for preventive measures / P. Karrari, O. Mehrpour, M. Abdollahi // *Daru.* - 2012. - Vol. 20. - N 1. - P. 2 - 12.

191. Karpatkin, S. Lead poisoning after taking Pb-Ac with suicidal intent / S. Karpatkin // Arch. Environ. Health. – 1961. – Vol. 2. – P. 679-684.
192. Katya-Katya, M. The effect of zinc supplementation on plasma cholesterol levels / M. Katya-Katya, A. Ensminger, L. Mèjean, et al. // Nutr. Res. - 1984. – V. 4. – P. 633-638.
193. Kazacos, E. A. Sequential ultrastructural changes of the pancreas in zinc toxicosis in ducklings / E. A. Kazacos, J. F Van-Vleet. – Am. J. Pathol. - 1989. – V. 134. – P. 581-595.
194. Kehoe, R. A. The metabolism of lead in man in health and disease. The Harben lectures, 1960. Reprinted.
195. Kehoe, R. A. Standarts for the prevention of occupational lead poisoning / R.A. Kehoe // Arch. Env. Health. – 1971. - V. 23. - P. 245.
196. Kim, J. Y. Nephropathy in chronic lead poisoning / J. Y. Kim, K. Y. Jang, S. H. Rha et al. // J. Occup. Health – 1998. – Vol. 40. – P. 81-82.
197. Kim, Jong-Heon. Amyloid neurotoxicity is attenuated by metallothionein: dual mechanisms at work / Jong-Heon Kim, et al. // J. Neurochem. - 2012. - V. 121, № 5. - P. 751–762.
198. Klevay, L. M. Hypercholesterolemia in rats produced by an increase in the ratio of zinc to copper ingested / L. M. Klevay, S. D. Hyg // Am. J. Clin. Nutr. - 1973. – V. 26. – P. 1060-1068.
199. Klevay L.M., in Metabolism of Trace Metals in Man, Vol. 1, CRS Press, Boca Raton, Florida, 1984, p. 129.
200. Kosman, D. J. Plasma and serum zinc concentration / D. J. Kosman, R. I. Henkin // Lancet. - 1979. – V. 1. – P. 1410.
201. Kostial, K. Lead ions and synaptic transmission in the superior cervical ganglion of the cat / K. Kostial, V. B. Vouk // Br. J. Pharmacol. – 1957. - Vol. 12. – P. 219-224.
202. Krishnan, K. Physiologically based pharmacokinetic modeling in toxicology / In: Hayes A. W, ed. Principles and methods of toxicology. 3rd ed. New York : Raven Press, Ltd., 1994. - P. 149-188.

203. Lepper, T. W. Lead inhibits in vitro creatine kinase and pyruvate kinase activity in brain cortex of rats / T. W. Lepper, E. Oliveira, G.D. Koch, D.B. Berlese, L.R. Feksa // *Toxicol. In Vitro.* – 2010. – V. 3. – P. 1045-1051.
204. Lessber, M. A. Erythrocyte Osmotic Fragility in the presence of Pb or Hg / M. A. Lessber., M. I. Waiters // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* - 1973. Vol. 142. - P. 548-553.
205. Li, D. Metallothionein-I/II in brain injury repair mechanism and its application in forensic medicine / Li D., Li R.B., Lin J.L. // *Fa Yi Xue Za Zhi.* – 2013. – V. 5. - P. 365-377.
206. Lidsky, T. I. Lead neurotoxicity in children: basic mechanisms and clinical correlates / T. I. Lidsky, F. S. Schneider // *Brain.* - 2003. - Vol. 126. - P. 5-19.
207. Lü, J. Time-course studies of pancreatic exocrine damage induced by excess dietary zinc in the chick / J. Lü, G. F. Combs Jr, J. C. Fleet // *J. Nutr.* - 1990. – V. 120. – P. 389-397.
208. Maita, K. Subacute toxicity studies with zinc sulfate in mice and rats / K. Maita, M. Hirano, K. Mitsumori, et al. // *J. Pest. Sci.* - 1981. – V. 6. – P. 327-336.
209. Manalis, R. Presynaptic and postsynaptic effects of lead at the frog neuromuscular junction / R. Manalis, G. Cooper // *Nature.* - 1973. – Vol. 243. – P. 354.
210. Marchetti, C. Molecular targets of lead in brain neurotoxicity / C. Marchetti // *Neurotox. Res.* – 2003. - V. 5(3). – P. 221-236.
211. Maret, W. Metals on the move: zinc ions in cellular regulation and in the coordination dynamics of zinc proteins / W. Maret // *Biometals.* – 2011. – V. 24. – P. 411–418.
212. Margoshes, M. A cadmium protein from equine kidney cortex / M. Margoshes, B. L. Vallee // *J. Am. Chem. Soc.* – 1957. - Vol. 79(17). - P. 4813-4814.
213. McBean, L. D. Correlation of zinc concentrations in human plasma and hair / L. D. McBean, M. Mahloudji, J. G. Reinhold, et al. // *Am. J. Clin. Nutr.* - 1971. – V. 24. – P. 506-509.
214. McCord, C. P. Metal fume fever as an immunological disease / C. P. McCord // *Industr. Med. Surg.* - 1960. – V. 29. – P. 101-107.

215. Mehus, Aaron A. Quantitation of Human Metallothionein Isoforms: A Family of Small, Highly Conserved, Cysteine-rich Proteins / A. A. Mehus, W. W. Muhonen, S. H. Garrett, S. Somji, D. A. Sens, J. B. Shabb // *Mol. Cell. Proteomics*. – 2014. – V. 4. – P. 1020-1033. doi: 10.1074/mcp.M113.033373.
216. Mueller, E. J. Metal fume fever: A review / E. J. Mueller, D. L. Seger // *J. Emerg. Med.* - 1985. – V. 2. – P. 271-274.
217. Murray, R. K. Harper's Illustrated Biochemistry/ R. K. Murray, D. K. Granner, P. A. Mayes, V. W. Rodwell . -26th Ed. - Boston, N.Y. - McCraw-Hill Co, 2003. - 693 p.
218. Murphy, J. V. Intoxication following ingestion of elemental zinc / J. V. Murphy // *JAMA*. - 1970. – V. 212. – P. 2119-2120.
219. Murthy, L. Effect of dietary zinc and copper interrelationships on blood parameters of the rat / L. Murthy, H. G. Petering // *J. Agric. Food. Chem.* - 1976. – V. 24. – P. 808-811.
220. Needleman, H. L. Deficits in psychologic and classroom performance of children with elevated dentine lead level / H. L. Needleman, C. Gunnoe, A. Leviton, et al. // *New. Engl. J. Med.* – 1979. - V. 300. – P. 689-695.
221. Nemsadze, K. Mechanisms of lead-induced poisoning / Nemsadze K., Sanikidze T., Ratiani L., Gabunia L., Sharashenidze T. // *Georgian Med. News*. – 2009. - № 172-173. – P. 92-96.
222. Ogiso, T. Inhibitory effect of high dietary zinc on copper absorption in rats: II. Binding of copper and zinc to cytosol proteins in the intestinal mucosa / T. Ogiso, N. Ogawa, T. Miura // *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. - 1979. – V. 27(2). – P. 515-521.
223. Ohno, H. A study of zinc distribution in erythrocytes of normal humans / H. Ohno, R. Doi, K. Yamamura, et al. // *Blut*. - 1985. – V. 50. – P. 113-116.
224. Olafson, R. W. Electrochemical detection of metallothionein / R. W. Olafson, P. E. Olsson // *Method. Enzymol.* – 1991. – Vol. 205. - P. 205-213.
225. Oskarsson, A. Intracellular binding of lead in the kidney: the partial isolation and characterization of postmitochondrial lead binding components / A.

Oskarsson., K.S. Squibb, B.A. Fowler // *Biochem Biophys Res Commun.* - 1982. – V. 104(1). – P. 290–298.

226. Patil, A. J. Effect of lead (Pb) exposure on the activity of superoxide dismutase and catalase in battery manufacturing workers (BMW) of Western Maharashtra (India) with reference to heme biosynthesis / A. J. Patil, V. R. Bhagwat, J. A. Patil, et al. // *Int. J. Environ. Res. Public Health.* - 2006. - Vol. 3. - P. 329-337.

227. Patra, R. C. Oxidative Stress in Lead and Cadmium Toxicity and Its Amelioration / R. C. Patra, Amiya K. Rautray, D. Swarup // *Veterinary Medicine International Volume.* – 2011. - Article ID 457327, 9 pages.

228. Patrick, L. Lead toxicity, a review of the literature. Part 1: Exposure, evaluation, and treatment / L. Patrick // *Altern. Med. Rev.* - 2006. - Vol. 11. - N 1. - P. 2-22 (a).

229. Patrick, L. Lead toxicity part II: the role of free radical damage and the use of antioxidants in the pathology and treatment of lead toxicity / L. Patrick // *Altern. Med. Rev.* — 2006. - Vol. 11. - N 2. - P. 114-127 (b).

230. Prasher, D. Heavy metals and noise exposure: health effects/ D. Prasher // *Noise Health.* - 2009. - Vol. 11. - P. 141-144.

231. Provost, J. J. Alternate method for determining zinc in hair / J. J. Provost, P. Munnis, G. H. Morine // *Microchemical Journal.* -1993. - V. 47(1-2). – P. 28-32.

232. Rabinowitz, M. B. Kinetic analysis of lead metabolism in healthy humans / M. B. Rabinowitz, , G. W. Wetherill, J. D. Kopple // *J. Clin. Invest.* – 1976. –Vol. 58. – P. 260-270.

233. Rahil-Khazen, R. Trace element reference values in serum determined by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry / R. Rahil-Khazen, B. J. Bolann, R. J. Ulvik // *Clin. Chem. and Labor. Med.* – 2000. – V. 38. –P. 765–772.

234. Rahil-Khazen, R. Multielement analysis of trace element levels in human autopsy tissues by using inductively coupled atomic emission spectrometry technique (ICP-AES) / R. Rahil-Khazen, B. J Bolann., A. Myking. [et al.] // *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology.* – 2002. – V. 16. – P. 15–25.

235. Rainbow, P. S. Biomonitoring of trace metals in estuarine and marine environments / P. S. Rainbow // *Australasian Journal of Ecotoxicology*. – 2006. – Vol. 12. – P. 107–122.
236. Reichl, F. X. Toxicity of dental composite components and mercurials in human gingival fibroblast cells / F. X. Reichl, S. Simon, M. Esters, et al. // *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. Suppl.* – 2006. - V. 372 (1). - P 98.
237. Reinhold, J. G. Decreased absorption of calcium, magnesium, and phosphorous by humans due to increased fiber and phosphorous consumption as wheat bread / J. G. Reinhold, B. Faradji, P. Abadi, et al. // *Nutr. Rev.* - 1991. – V. 49(7). – P. 204-206.
238. Richards, M. P. Mammalian zinc homeostasis: Requirement for RNA and metallothionein synthesis / M. P. Richards, R. J. Cousins // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 1975. – V. 64. – P. 1215-1223.
239. Rivlin, R. S. Misuse of hair analysis for nutritional assessment / R. S. Rivlin // *Am. J. Med.* - 1983. – V. 75. – P. 489-493.
240. Ronnback, L. Chronic encephalopathies induced by mercury or lead: Aspects of underlying cellular and molecular mechanisms / L. Ronnback, E. Hansson // *Br. J. Ind. Med.* - 1992. - V. 49. - P. 233-240.
241. Rosen, J. F. Trends in the management of childhood lead poisoning / J. F. Rosen, M. E. Markowitz // *J. Neurotoxicol.*- 1993. – V. 14 (2-3). – P. 211-217.
242. Ruttkay-Nedecky, B. The Role of Metallothionein in Oxidative Stress / B. Ruttkay-Nedecky, et al. // *Int. J. Mol. Sci.* - 2013. - V. 14, № 3. - P. 6044-6066. doi:10.3390/ijms14036044.
243. Ryvolova, M. Analytical methods for metallothionein detection / M. Ryvolova, S. Krizkova, V. Adam, M. Beklova, et al. // *Current Analytical Chemistry*. – 2011. – Vol. 7. – P. 243-261.
244. Saber-Tehrani, M. Determination of total and methyl mercury in human permanent healthy teeth by electrothermal atomic absorption spectrometry after extraction in organic phase / M. Saber-Tehrani, M. H. Givianrad, H. Hashemi-Moghaddam // *Talanta*. – 2007. - V. 71 (3). – P. 1319-1325.

245. Schroeder, H. A. Essential trace minerals in man: zinc. Relation to environmental cadmium / H. A. Schroeder, A. P. Nason, I. H. Tipton, J. J. Balassa // *J. Chron. Dis.* – 1967. – V. 20. P. 179 - 183.

246. Sealand, C. J. Chemical factors affecting the intestinal absorption of zinc in vitro and in vivo / C. J. Sealand, F. W. Heaton // *Brit. J. of Nutrition.* – 1983. – Vol. 50 (02). – P. 317-324.

247. Seppalainen, A. M. Subclinical neuropathy at “safe” levels of lead exposure / A. M. Seppalainen, S. Tola, S. Hemberg // *Arch. Environ. Health.* – 1975. – V. 30. – P 181-192.

248. Seshan, S. V. Renal disease. Classification and atlas of tubulointerstitial and vascular diseases / S. V. Seshan, V. D. D’Agatti, G. A. Appel et al. - Baltimor : Williams & Wilkins, 1999. – 399 p.

249. Sharif, R. The role of zinc in genomic stability / R. Sharif, P. Thomasa, P. Zalewskib, M. Fenech // *Mutation Research.* – 2012. - V. 733. – P. 111– 121.

250. Sharma, R. Alterations in developing RBCs after prenatal and postnatal exposure to lead acetate and vitamins / R. Sharma, K. Panwar, S. Mogra // *IJPSR.* – 2013. Vol. 4(8). - P. 3214-3224.

251. Sharma, S. Biomarkers in Parkinson’s disease (recent update) / S. Sharma, et al. // *Neurochem. Int.* - 2013. - V. 63, № 3. - P. 201-229. doi.org/10.1016/j.neuint.2013.06.005.

252. Skutkova, H. Structure, Polymorphisms and Electrochemistry of Mammalian Metallothioneins – A Review / H. Skutkova, P. Babula, M. Stiborova, T. Eckschlager, et al. // *Int. J. Electrochem. Sci.*, 2012. – Vol. 7. – P. 12415 – 12431.

253. Song, M. K. Prostaglandin interacts with steroid sex hormones in the regulation of intestinal zinc transport / M. K. Song, Y. Y. Kim, M. C. Y. Heng, et al. // *Comp. Biochem. Physiol.* - 1992. V. 101 A(3). – P. 477-481.

254. Spencer, H. Further studies of the effect of zinc on intestinal absorption of calcium in man / H. Spencer, C. Norris, D. Osis // *J. Am. Coll. Nutr.* - 1992. – V. 11(5). – P. 561-566.



255. Steeman-Nielsen, E. Influence of deleterious concentrations of copper on the growth of *Chlorella pyrenoidosa* / E. Steeman-Nielsen, L. Kamp-Nielsen // *Physiol. Plant.* - 1970. - Vol. 23. - P. 828-840.
256. Stewart, C.P. *Toxicology*, Vols. 1–2. Edited by C. P. Stewart and A. Stolman / C. P. Stewart, A. Stolman. - New York, 1960–61. – 962 p.
257. Straube, E. F. Zinc toxicity in the ferret / E.F. Straube, N.H. Schuster, A.J. Sinclair // *J. Comp. Pathol.* - 1980. – V. 90. – P. 355-361.
258. Suzuki, K. T. Structure and function of metallothionein / K. T. Suzuki // *Nippon Rinsho.* – 1996. – Vol. 54(1). – P. 33-9.
259. Szpunar, C. B. Analysis of excavated bone by atomic absorption / C. B. Szpunar, J. B. Lambert, J. E. Buikstra // *Am. J. Phys. Anthrop.* - 1978. – Vol. 48. - P. 199-202.
260. Tsuchiya, K. Interrelationships among zinc, copper, lead, and cadmium in food, faeces, and organs of humans / K.Tsuchiya, S. Iwao // *Environ. Health Perspect.* - 1978. – V. 25. – P. 119-124.
261. Ullmans *Encyclopedia technischen Chemie*. Weinheim : Verl. Chem., 1977. - P. 578-581.
262. Virgolini, M. B. Interactions of chronic lead exposure and intermittent stress: consequences for brain catecholamine systems and associated behaviors and HPA axis function / M. B. Virgolini, K. Chen, D. D. Weston // *Toxicol. Sci.* – 2005. – Vol. 87(2). – P. 469-482.
263. Vijver, Martina G. Metal-specific interactions at the interface of chemistry and biology / G. Vijver Martina // *Pure and Applied Chemistry.* – 2007. – V. 79. – P. 2351-2366.
264. Vogelmeier, C. Pulmonary involvement in zinc fume fever / C. Vogelmeier, G. Konig, K. Bencze et al. // *Chest.* - 1987. – V. 92. – P. 946-949.
265. Wang, D. Studying zinc homeostasis in *Escherichia coli* using carbonic anhydrase - based ratiometric sensors : A dissertation submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy (Chemical Biology) in the University of Michigan, 2012. – P. 180.

266. Wastney, M. E. Kinetic analysis of zinc metabolism and its regulation in normal humans / M. E. Wastney, , R. L. Aamodt, , W. F. Rumble, , R. I. Henkin // *Am. J. Physiol.* – 1986. – V. 251. – P. 398-408.

267. Wilhelm, M. Monitoring of cadmium, copper, lead and zinc status in young children using toenails: Comparison with scalp hair / M. Wilhelm, D. Hafner, I. Lombeck, et al. // *Sci. Total Environ.* – 1991. – V. 103. – P. 199-207.

268. Wood J.M. *Metal Ions in Biological Systems.* - Vol. 18 (H.Sigel, ed) Marcel Dekker, New York, 1984. P. 223.

269. World Health Organization. Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food / The 26th meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). - Geneva. - 1982.

270. Yoshida, M. Effects of zinc, selenium, and calcium on the nephrotoxicity of cadmium in primary cultures of rat renal proximal epithelial cells / M. Yoshida, M. Fumukmoto, T. Kishimoto, et al. // *Biol. Trace Elem. Res.* - 1993. – V. 36(3). – P. 219-227.

271. Zalewska, M. The role of metallothionein interactions with other proteins / M. Zalewska, J. Trefon, H. Milnerowicz // *Proteomics.* - 2014, V. 00. – P. 1–14. DOI 10.1002/pmic.201300496.

## ПРИЛОЖЕНИЕ

Краевое государственное бюджетное  
учреждение здравоохранения

«Красноярское краевое бюро  
судебно-медицинской экспертизы»

(КГБУЗ ККБСМЭ)

пр. Мира, д. 35, г. Красноярск, 660049  
Тел.: (391) 227-17-39  
Факс: (391) 227-25-71  
E-mail: [sme@sme.krsk.ru](mailto:sme@sme.krsk.ru), [krsk@sudmed.info](mailto:krsk@sudmed.info)  
http: [www.sme.krsk.ru](http://www.sme.krsk.ru)

ОКПО/ОГРН 21890699/1032402947378

ИНН/КПП 2466064557/246601001

от 25 МАЙ 2016 № 3971  
на № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_

Г Об утверждении акта внедрения Г

«Утверждаю»

Начальник КГБУЗ  
«Красноярское краевое бюро  
судебно-медицинской экспертизы»

А. В. Донской

« 25 » \_\_\_\_\_ 2016 года



## АКТ О ВНЕДРЕНИИ

**Наименование предложения для внедрения:** результаты по разработке методики комплексного определения свинца и цинка в биологических объектах при проведении судебно-химического исследования в виде аналитической методики атомно-абсорбционной спектрометрии.

**Источник информации:** результаты диссертационной работы Кутякова Виктора Андреевича по теме «Комплексный подход к оценке воздействия соединений свинца и цинка при судебно-химических исследованиях».

**Где и когда внедрено:** КГБУЗ «Красноярское краевое бюро судебно-медицинской экспертизы», начало внедрения – май 2014 г.

**Форма внедрения:** Проведение экспертных исследований в судебно-химическом отделении КГБУЗ «Красноярское краевое бюро судебно-медицинской экспертизы».

**Эффективность внедрения:** повышение качества, доказательной базы и сокращение сроков проведения судебно-медицинских экспертиз.

**Замечания и предложения:** рекомендуется внедрение полученных результатов в практическую деятельность подразделений бюро по установлению причины смерти от отравлений соединениями свинца и цинка при проведении судебно-медицинских экспертиз.

Заведующий судебно-химическим отделением  
КГБУЗ «ККБСМЭ», к.х.н.

Г. А. Слащенин

Кутяков Виктор Андреевич  
т. 220-13-62







Государственное бюджетное  
образовательное учреждение  
высшего профессионального образования  
«Красноярский государственный  
медицинский университет  
имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого»  
Министерства здравоохранения  
Российской Федерации  
ГБОУ ВПО КрасГМУ  
им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого  
Минздрава России

Партизана Железняк ул., д. 1, г. Красноярск, 660022  
тел. 220-13-95 факс (391) 228-08-60, e-mail: rector@krasgmu.ru  
ОКПО: 01962882 ОГРН: 1022402471992  
ОКТМО: 04701000  
ИНН/КПП: 2465015109/246501001

24 МАЙ 2016 № 10-08-10/2928

На № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_

Г  
«УТВЕРЖДАЮ»

Ректор ГБОУ ВПО КрасГМУ  
им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого  
Минздрава России  
д.м.н., профессор

И.П. Артюхов

2016 г.



### АКТ О ВНЕДРЕНИИ

**Наименование предложения для внедрения:** результаты по разработке методики комплексного определения свинца и цинка в биологических объектах при проведении судебно-химического исследования в виде аналитической методики атомно-абсорбционной спектрометрии, протоколов гистологического и иммуногистохимического исследования по теме «Судебно-медицинские аспекты экспертизы отравлений».

**Источник информации:** результаты диссертационной работы Кутякова Виктора Андреевича по теме «Комплексный подход к оценке воздействия соединений свинца и цинка при судебно-химических исследованиях».

**Где и когда внедрено:** ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава РФ», кафедра судебной медицины ИПО, начало внедрения – октябрь 2014 г.

**Форма внедрения:** Чтение лекций и проведение практических занятий со студентами 4, 5, 6 курсов очной формы обучения лечебного, педиатрического факультетов, института стоматологии, курсантов института последипломного образования, интернов КрасГМУ по специальности «Судебно-медицинская экспертиза».

**Эффективность внедрения:** повышение уровня подготовки специалистов (специальности 060101 Лечебное дело, 060103 Педиатрия, 060201 Стоматология), судебно-медицинских экспертов по использованию методов доказательной медицины при проведении судебно-медицинских экспертиз.

**Замечания и предложения:** рекомендуется внедрение полученных результатов в учебный процесс как обучающих методик по установлению причины смерти от отравлений соединениями свинца и цинка при проведении судебно-медицинских экспертиз.

Заведующий кафедрой  
судебной медицины ИПО,  
доктор медицинских наук, профессор

В. И. Чикун