



На правах рукописи

Кутяков Виктор Андреевич

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

14.03.04 – токсикология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Красноярск – 2016

Диссертационная работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель: **Салмина Алла Борисовна**
доктор медицинских наук, профессор

Официальные оппоненты: **Афанасьев Василий Владимирович**
доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, профессор кафедры скорой медицинской помощи
Горбачева Татьяна Васильевна
кандидат фармацевтических наук, Санкт-Петербургское государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Бюро судебно-медицинской экспертизы», заведующая судебно-химическим отделением

Ведущая организация:

Государственное бюджетное учреждение «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи им. И.И. Джанелидзе»

Защита состоится «17» января 2017 г. в 11 часов на заседании диссертационного совета Д 208.030.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства» (192019, Санкт-Петербург, ул. Бехтерева, 1).

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства» <http://www.toxicology.ru/>

Автореферат разослан « ____ » _____ 2016 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор медицинских наук,
профессор



Луковникова
Любовь Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

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]. 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.]. 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 «Токсическое действие цинка и его соединений» [Приказ Минздрава РФ от 27 мая 1997 г. № 170].

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. К существенным недостаткам относится длительность пробоподготовки, отсутствие комплексной оценки результатов судебно-химического исследования, унификации методов количественного определения элементов. В практике судебно-химических отделений бюро судебно-медицинской экспертизы методически не закреплены требования к выбору объекта анализа, моменту отбора биопробы и ее количества [Лузанова И.С., 2008].

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

Особая актуальность изучения индукции синтеза металлотионеина-1 (МТ-1) в настоящее время связана с необходимостью проведения 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.

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

Цель исследования

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

Задачи исследования

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-1 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 металлотионеина 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); VI 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 ГБОУ ВПО «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 КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России. 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 166 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.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования

В качестве экспериментальных животных использовались крысы линии Wistar (половозрелые самцы и самки, масса 150-200 г). Были сформированы 2 опытные («свинцовая» и «цинковая») и 1 контрольная группы. Животным, входящим в группу, токсикант вводили в одинаковой дозе, а в каждой последующей подгруппе доза увеличивалась. Формирование подгрупп осуществлялось методом случайных выборок [Куценко, С. А., 2002]. Для достижения цели исследования применялись следующие методы: атомно-абсорбционная спектрометрия, иммуногистохимический, световая микроскопия.

Объекты исследования: образцы тканей, полученные от экспериментальных животных. Экспериментальные группы и дизайн исследования представлены на рисунке 1.

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).

Моделирование острого отравления соединениями свинца и цинка осуществляли путем внутрибрюшинного введения 0,15-0,25 см³ растворов свинца и цинка различной концентрации в зависимости от массы крыс с помощью шприца однократного применения. Содержание цинка и свинца в стандартных растворах для инъекций - 100 мг/см³, при необходимости проводилось кратное разведение. Контрольной группе аналогично вводился раствор натрия хлорида 0,9%, приготовленный на деионизованной воде. Через 72 часа после введения осуществлялся вывод животных из эксперимента, отбор представительных проб.

Унифицированная методика подготовки проб к атомно-абсорбционному измерению заключалась в микроволновом разложении образцов путем полного окисления сложной органической матрицы до простых неорганических веществ и перевод цинка, свинца, а также других металлов в анализируемый раствор.

Выполнение измерений проводилось методом атомно-абсорбционного анализа на спектрометрах AAnalyst-600 и SolaarM6. Для построения градуировочных графиков использовали стандартные растворы, приготовленные в день измерений из ГСО состава раствора ионов свинца и цинка с концентрацией 1,00 мг/мл. Градуировочные графики линейны в указанных диапазонах концентраций (коэффициенты корреляции при определении свинца – 0,9999, цинка - 0,9991).

Обработка результатов анализа, расчет содержания элементов в образцах проводились 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:

$$X = \frac{C_1V_1 - C_2V_2}{m_0} \quad \text{где}$$

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.

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 металлотнионина-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 1 - Дизайн исследования

Иммуногистохимическое исследование. Изъятые органы экспериментальных животных помещались в забуференный 10% формалин с дальнейшим изготовлением парафиновых блоков. Приготовление парафиновых блоков, обзорную оценку препаратов, окраску гематоксилином и эозином осуществляли по стандартной методике [Коржевский Д.Э., 2010]. Для оценки экспрессии металлотioneина применяли первичные антитела к металлотioneину – моноклональные (Metallothionein Mouse anti-Rabbit Monoclonal (UC1MT) Antibody - LS-B3698 – LSBio) в разведении 1:100. Для детекции первичных антител использовались вторичные поликлональные антитела (Mouse IgG Horse anti-Mouse Polyclonal (Biotin) Antibody - LS-D2 – LSBio) в разведении 1:100. Производитель – Life Span BioSciences, Inc. Микроскопировали на световом микроскопе Olympus CX41. Ставили позитивные и негативные контрольные реакции.

Гистологическое исследование. При проведении гистологического исследования производили сопоставление морфофункциональных особенностей изучаемых органов с их нормальной структурой. Морфологическое исследование проводилось на микроскопе Olympus BX45 с насадкой для фото- видео документации Olympus DP 25 и пакетом программного обеспечения Cell[^]D. Морфометрию осуществляли с помощью пакетов прикладных программ для морфометрии Cell[^]D и JMicroVision 1.2.7

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

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 [Q₁; Q₃]. 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 $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты определения валового содержания свинца и цинка в объектах исследования представлены в таблицах 1, 2.

Таблица 1 - 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± 0,003	0,014± 0,005 <i>p₁<0,001</i>	0,18± 0,05 <i>p₂<0,001</i>	0,21± 0,04 <i>p₃<0,001</i>	0,44± 0,06 <i>p₄<0,001</i>	0,61± 0,08 <i>p₅<0,001</i>	0,78± 0,19 <i>p₆<0,001</i>
Кровь	<0,001	0,06± 0,02 <i>p₁<0,001</i>	0,16± 0,06 <i>p₂<0,001</i>	0,71± 0,15 <i>p₃<0,001</i>	0,9± 0,14 <i>p₄<0,001</i>	1,3± 0,15 <i>p₅<0,001</i>	3,4± 0,4 <i>p₆<0,001</i>
Почка	0,013± 0,003	1,3± 0,4 <i>p₁<0,001</i>	15± 3 <i>p₂<0,001</i>	21,1± 7 <i>p₃<0,001</i>	26,0± 5 <i>p₄<0,001</i>	31,1± 5 <i>p₅<0,001</i>	48,2± 8 <i>p₆<0,001</i>
Печень	0,009± 0,001	0,61± 0,15 <i>p₁<0,001</i>	4,9± 1,4 <i>p₂<0,001</i>	108,1± 19 <i>p₃<0,001</i>	113,2± 17 <i>p₄<0,001</i>	121,1± 17 <i>p₅<0,001</i>	130± 23 <i>p₆<0,001</i>
Селезенка	0,009± 0,002	0,19± 0,07 <i>p₁<0,001</i>	7,6± 0,9 <i>p₂<0,001</i>	90± 13 <i>p₃<0,001</i>	114,2± 14 <i>p₄<0,001</i>	476,4± 37 <i>p₅<0,001</i>	921,5± 100 <i>p₆<0,001</i>
Шерсть	0,011± 0,005	0,052± 0,006 <i>p₁<0,001</i>	0,12± 0,03 <i>p₂<0,001</i>	0,91± 0,18 <i>p₃<0,001</i>	1,0± 0,19 <i>p₄<0,001</i>	4,6± 0,29 <i>p₅<0,001</i>	20,0± 4 <i>p₆<0,001</i>

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

Проверка правильности и воспроизводимости методики определения свинца и цинка проводилась с использованием: 1) метода добавок (Таблица 3), при этом добавки вводили в анализируемые образцы контрольной группы и проводили через все стадии аналитического цикла; 2) способом варьирования (удвоения) массы навески образца (Таблица 4); 3) сравнением результатов с результатами, полученными методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой (Таблица 5).

Таблица 2 - Результаты 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	14,0±0,5	14,6±0,7	12,9±0,9	14,4±0,47	16,3±1,0
		$p_1=0,8$	$p_2=0,9$	$p_3=0,8$	$p_4=0,5$	$p_5=0,8$	$p_6=0,1$
Кровь	3,9±0,5	3,2±0,6	3,1±0,4	3,2±0,52	3,2±0,77	3,9±0,3	6,1±0,7
		$p_1=0,4$	$p_2=0,3$	$p_3=0,4$	$p_4=0,5$	$p_5=1$	$p_6=0,05$
Почка	23,5±2	24,1±4	23,0±2	27,1±5	32,3±6,6	40,9±7,3	50,1±5
		$p_1=0,9$	$p_2=0,9$	$p_3=0,6$	$p_4=0,2$	$p_5=0,05$	$p_6<0,001$
Печень	25,7±4	33±3	38,1±5	44,3±3	91,4±13,8	106,8±5,4	116±9
		$p_1=0,2$	$p_2=0,1$	$p_3=0,005$	$p_4=0,002$	$p_5<0,001$	$p_6<0,001$
Селезенка	22,7±3	26,2±3	23,2±2	25,1±5	25,4±3,9	27,8±4,1	34±5
		$p_1=0,5$	$p_2=0,9$	$p_3=0,7$	$p_4=0,6$	$p_5=0,3$	$p_6=0,05$
Шерсть	198,2±24	228±17	226,1±22	234±6	232±9,2	227±15,7	226±11
		$p_1=0,3$	$p_2=0,5$	$p_3=0,2$	$p_4=0,3$	$p_5=0,4$	$p_6=0,4$

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

Таблица 3 - 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 (экспериментальная 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 4 - 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 5 - 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

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 свинца выявлены более выраженные морфологические изменения в органах по сравнению с таковыми при введении цинка.

Морфометрическое исследование. 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.

Результаты морфометрического исследования почки

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 6).

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 6).

При сравнении между собой площади мочевого пространства отмечается статистически значимое его увеличение 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 6).

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 6). 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 6).

Таблица 6 - Морфометрические показатели почки крыс при воздействии свинца и цинка

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

клубочка, мкм ²	6710]	[4750;5900]		[6000; 7300]	
Площадь мочевого пространства, мкм ²	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

p - значимость различий по критерию Манна-Уитни

Результаты морфометрического исследования 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 7).

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 7).

Таблица 7 - Морфометрические показатели печени крыс при воздействии свинца и цинка

Показатель	Контроль	Свинец	p	Цинк	p
Площадь ядер гепатоцитов, мкм ²	34 [30; 38]	35 [31; 38]	0,9	44[39; 49]	0,01
Площадь гепатоцитов, мкм ²	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 $0,14 \pm 0,04$ до $0,20 \pm 0,05$ ($p=0,001$) и цинка – с $0,14 \pm 0,04$ до $0,16 \pm 0,03$ ($p=0,001$).

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.

Результаты выявления экспрессии металлотиюнеина-1 иммуногистохимическим методом. Экспрессия МТ-1 у животных контрольной группы носила слабовыраженный характер в почках и печени (Рисунок 6, 7), не наблюдалась в головном мозге, селезенке. При свинцовой и цинковой интоксикации у животных экспрессия МТ-1 изменяется (Таблица 8).

Таблица 8 - Результаты иммуногистохимического исследования

	Контроль					Свинец					Цинк				
	4+	3+	2+	+	-	4+	3+	2+	+	-	4+	3+	2+	+	-
Головной мозг					3					3			1	2	
Печень				3		2	1								3
Почка				2	1	3									3
Селезенка					3					3					3

Из контрольных образцов экспрессия металлотиюнеина 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.

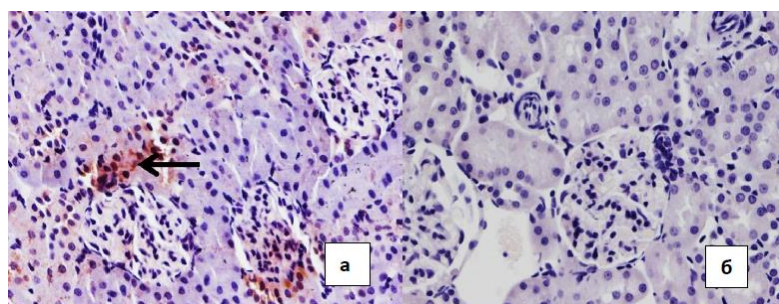


Рисунок 6 - Контрольная группа: а - единичные позитивные клетки в почке, антитела к МТ-1; б – негативное иммуноокрашивание без антител, почка. Увеличение x400

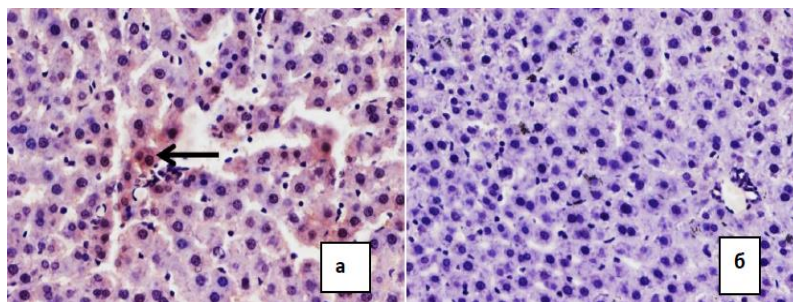


Рисунок 7 - Контрольная группа: а- единичные позитивные клетки в печени, антитела к МТ-1; б – негативное иммуноокрашивание без антител, печень. Увеличение x400

При свинцовой и цинковой интоксикации у животных экспрессия МТ изменяется.

При свинцовой интоксикации в почках экспрессия носит выраженный характер - равномерная экспрессия МТ в эпителии собирательных трубочек и неравномерная, умеренная – в почечном тельце, более интенсивная - в области ЮГА (Рисунок 8).

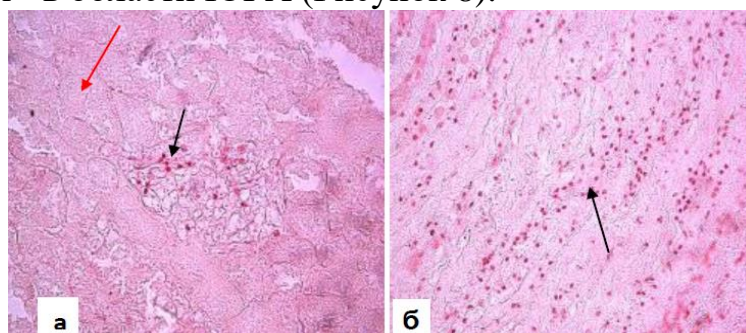


Рисунок 8 - Иммуногистохимическое исследование почек при введении свинца. а – выраженная экспрессия МТ в отдельных эндотелиоцитах гломерулярных капилляров (черная стрелка); отсутствие экспрессии МТ в некротизированных эпителиоцитах извитых канальцев (красная стрелка); б – выраженная экспрессия МТ в эпителиоцитах собирательных трубочек. Увеличение x400

В печени – выраженная и неравномерная экспрессия МТ в гепатоцитах 3 зоны ацинуса (Рисунок 9).

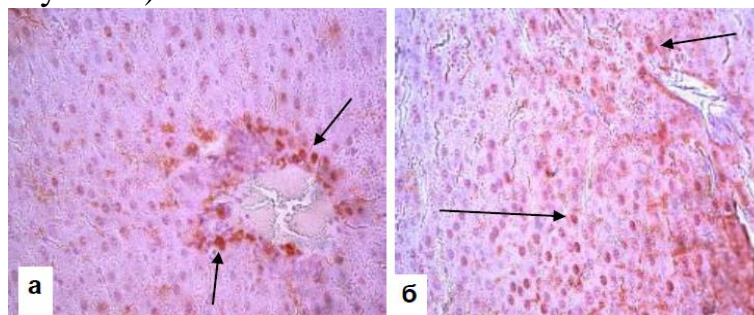


Рисунок 9 - Иммуногистохимическое исследование печени при введении свинца. а – выраженная экспрессия МТ в перивенулярных

гепатоцитах. б – умеренная экспрессия МТ в гепатоцитах третьей зоны ациноса. 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. При введении цинка нами отмечена слабая экспрессия МТ в части нейронов головного мозга, элементах глии и эндотелиоцитах (Рисунок 10), отсутствие экспрессии МТ в контрольной группе (Рисунок 11).

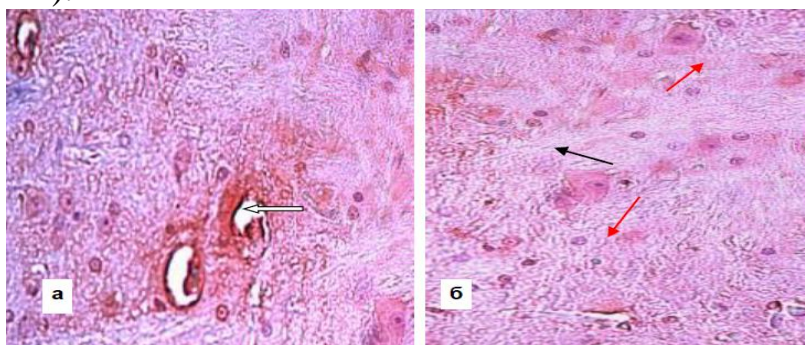


Рисунок 10 - Иммуногистохимическое исследование головного мозга при введении цинка. а, б – слабая экспрессия металлотioneина в эндотелиоцитах, цитоплазме клеток глии и нейронов. x400

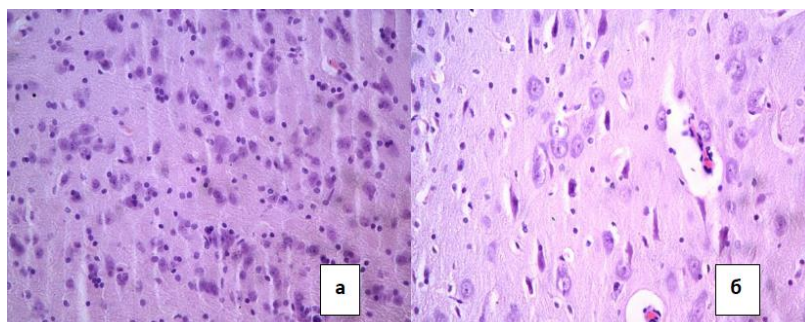


Рисунок 11 - Контрольная группа: а – негативное иммуноокрашивание в головном мозгу, антитела к МТ-1; б – негативное иммуноокрашивание без антител, головной мозг. Увеличение x400

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.

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

1. 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. 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. Выявлены некоторые характерные признаки поражения структурных почек и печени при интоксикации соединениями свинца и цинка.

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).

Заключение. В целом, схему проведения комплексного исследования биологических объектов на наличие свинца и цинка можно представить как многоступенчатую, состоящую из нескольких стандартных операционных процедур – рисунок 12.

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 металлотioneина-1 при остром воздействии свинца является тканеспецифичной, наибольшей – в печени, почке. При

воздействии соединений цинка выявлена слабая, диффузная экспрессия металлотioneина-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 металлотioneина-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.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность ректору ГБОУ ВПО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России д.м.н., профессору И.П. Артюхову за оказанную поддержку, заведующему кафедрой судебной медицины ИПО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России д.м.н., профессору В.И. Чикуну за неоценимую консультативную помощь при подготовке диссертации.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ для публикации материалов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук:

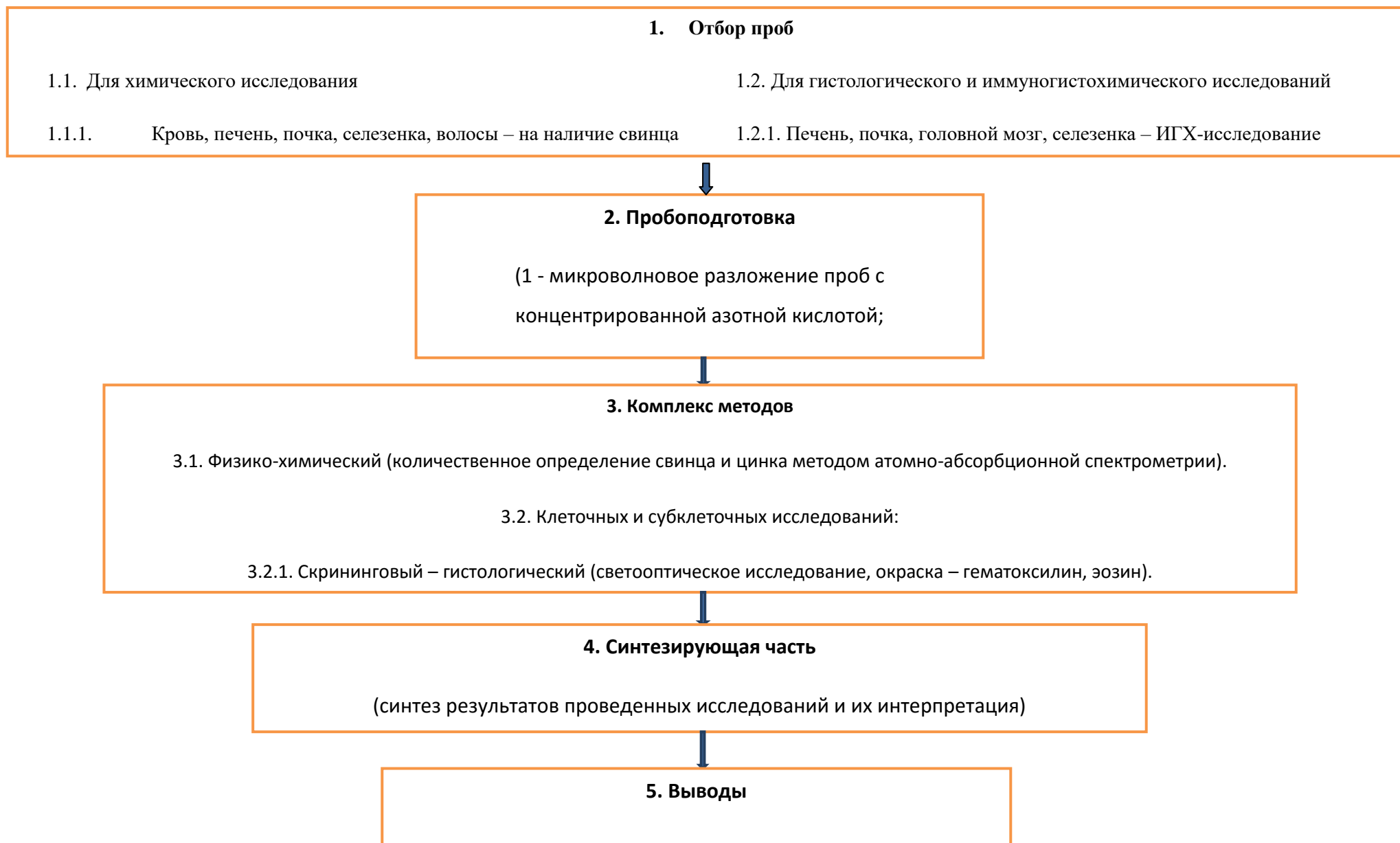
1. Атомно-абсорбционное определение свинца и цинка при моделировании процесса экзогенной интоксикации соединениями свинца / **В.А. Кутяков**, А.Б. Салмина, Н.В. Мазняк, А.П. Морозова, В.Н. Лосев // Вестник Уральской медицинской академической науки. - 2011. - № 3. - С.35-36.

2. Особенности экспрессии металлотионеина в органах крысы при интоксикации цинком и свинцом / **В.А. Кутяков**, Л.А. Шестакова, А.Б. Салмина, В.А. Чикун // Сибирское медицинское обозрение. - 2014. - № 2.- С.29-34.

3. Металлотионеины как сенсоры и регуляторы обмена металлов в клетках (обзор литературы) / **В. А. Кутяков**, А. Б. Салмина // Бюллетень сибирской медицины. – 2014, т. 13. - № 3. – С. 91-99.

4. Концентрация макро- и микроэлементов в биологических объектах как диагностический признак в судебно-медицинской экспертной практике / **В. А. Кутяков**, А. Б. Салмина, В. И. Чикун // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). – 2015. - № 3. – С. 14 – 20.

Рисунок 12 - Схема проведения комплексного исследования биологических объектов на наличие свинца и цинка



Материалы конференций

5. Отравление жидкостью, содержащей тяжелые металлы / **В.А. Кутяков**, С.Л. Парилов // Актуальные вопросы судебно-медицинской экспертизы: Сборник научных трудов, посвященный 50-ти летию образования Красноярской краевой судебно-медицинской экспертизы.- Красноярск.- 2002.- С.174.

6. Редкий случай отравления мышьяком / **В.А. Кутяков**, С.Л. Парилов, Т.П. Прошина // Актуальные вопросы судебной медицины и экспертной практики: Сборник научных трудов, посвященный 70-летию образования Красноярского края.- Красноярск.- 2004.- С.126-127.

7. Атомно-абсорбционное определение содержаний свинца и цинка в тканях органов крыс / А.П. Морозова, **В.А. Кутяков**, Н.В. Мазняк, В.Н. Лосев // 9 Международное Курнаковское совещание по физико-химическому анализу: тез.докладов.- Пермь.- 2010.- С.294.

8. Атомно-абсорбционное определение свинца и цинка в межклеточной жидкости и клетках ткани почек и печени лабораторных животных при моделировании процесса экзогенной интоксикации соединениями свинца / Н.В. Мазняк, **В.А. Кутяков**, А.П. Морозова, В.Н. Лосев // Экология и жизнь: сборник статей XX Международной научно-практической конференции.- Пенза, АННОО Приволжский Дом знаний.- 2011.- С.134-138.

9. Современная унифицированная методика пробоподготовки биологических проб для атомно-абсорбционного определения тяжелых, цветных и щелочных металлов / **В.А. Кутяков**, Н.В. Мазняк // Химическая наука и образование Красноярья. Материалы У1 Региональной научно-практической конференции, посвященной 80-летию КГПУ им. В.П. Астафьева и 70-летию КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого.- Красноярск, КГПУ им. В.П. Астафьева.- 2012.- С.68-72.

10. Электротермическое атомно-абсорбционное определение серебра в тканях лабораторных животных с использованием микроволнового разложения / Н.В. Мазняк, В.Н. Лосев, **В.А. Кутяков**, А.Б. Салмина // XX Международная Черняевская конференция по химии, аналитике и технологии платиновых металлов, Красноярск, 2013. – доклад.

11. Применение методики атомно-абсорбционного определения натрия для исследования степени токсического поражения органов лабораторных животных соединениями свинца (Стеновый доклад) / **В. А. Кутяков**, Н. В. Мазняк, А. П. Верхотурова // IX Научная конференция Аналитика Сибири и Дальнего Востока. – Красноярск, 2012.

12. Синтез и фармакологическая активность металлокомплексов цинка / **В.А. Кутяков**, А.Б. Салмина, В.И. Чикун // Современные тенденции и перспективы развития фармацевтического образования и науки в России и за рубежом (Материалы научно-практической конференции с международным участием, 21-23 ноября 2013 года). - Пермь, 2013. - № 11. – С. 88-90.

Подписано в печать __.__.201__ г.

Заказ № тираж ____ экз.

Отпечатано в типографии «_____»

г. Красноярск, _____