

УДК 615.099.07

## АЛГОРИТМ ЛАБОРАТОРНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ ПРИ ПІДОЗРІ НА ДИСГОМЕОСТАЗ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ

*Шафран Л.М., Пихтеева О.Г., Большой Д.В.*

*Український НДІ медицини транспорту, Одеса, pyhteeva@rambler.ru*

Запропоновано алгоритм лабораторних досліджень при підозрі на дисгомеостаз важких металів (недостатність есенціальних елементів або металлотоксікоз), який містить рекомендації щодо вибору оптимального біосубстратах в залежності від часу дії та дози.

**Ключові слова:** важкі метали, металотіонеїн, інтоксикація, недостатність цинку

### Актуальність

Друга половина ХХ-го і початок ХХІ-го століття ознаменувалися не тільки суттєвим зростанням темпів науково-технічного прогресу, але й прогресивним антропогенним навантаженням на всі сфери життєдіяльності людини. Вже у 1974 р. ВООЗ були визначені 8 класів пріоритетних забруднювачів природного середовища, до числа яких увійшли важкі метали (ВМ): кадмій, свинець і ртуть [1].

Проте якщо раніше йшлося переважно про професійні отруєння ВМ, то сучасні зумовлені експозицією цими мікроелементами патологічні зрушення стосуються набагато ширших контингентів ризику (діти, вагітні жінки, особи похилого віку тощо), джерелами надходження яких до організму є питна вода, харчові продукти, забруднене природне довкілля.

В механізмах реалізації біологічної ролі важких металів (ВМ) провідна роль належить металотранспортним білкам, особливе місце серед яких займають металотіонеїни (МТ) [2]. Представники суперсімейства цих білків з молекулярною масою близько 7 кДа присутні практично в кожному живому організмі від мікробів до людини. Вони характеризуються високим вмістом цистеїну (близько 30% по масі), які знаходяться у відновленій формі та скоординовані з іонами ме-

талів через SH-групи [3]. Особливе розташування залишків цистеїну дозволяє МТ зв'язувати з високою афінністю атоми одно- і двовалентних металів, а їх наявність дає можливість знижувати вміст активних форм кисню та азоту в клітинах [4].

### Контингенти та методи

Лабораторні дослідження проводили серед різних контингентів, які відрізняються віком, статтю, ступенем контакту з шкідливими виробничими і екологічними чинниками. Для досліджень були відібрані 3 основних групи осіб, які постійно мешкають в м. Одесі:

1. Практично здорові неекспоновані люди (групи підвищеного ризику - діти, підлітки під час інтенсивного росту, вагітні жінки, здорове працездатне населення, яке контактує з ВМ в умовах виробничої діяльності)
2. Хворі (пацієнти кардіологічного, ендокринологічного, нефрологічного відділень та відділення гемодіалізу обласної лікарні).
3. Робітники, що були експоновані ВМ під час виробничої діяльності

Всього за 15 років обстежено понад 1000 осіб.

При обстеженні людей в якості біосубстратів використовували волосся, кров (цільну, або еритроцитарну масу и сироватку), сечу. Пробопідготовку проводили загальноприйнятими ме-

тодами з урахуванням доповнень та змін, запропонованих нами в ході попередніх аналітичних досліджень.

Вимірювання вмісту ВМ проводили методом атомно-емісійної спектроскопії з електродугової атомізацією на спектрометрі ЭМАС-200 CCD, Атомно-абсорбційному спектрометрі «Сатурн-3» з електротермічною та полум'яневою атомізацією. Вимірювання вмісту ртуті проводили методом атомної абсорбції «холодної пари» на приладі «Юлія-2М», модернізованому в ФХІ ім. Богатського НАН України. Визначення інтегральної концентрації МТ проводили за власною методикою [2].

### Результати та їх обговорення

Проведені нами епідеміологічні дослідження вмісту ВМ в організмі різних контингентів населення, які мали виробничо та екологічно зумовлений контакт з цими ксенобіотиками, показали що в кожній з досліджуваних груп достатньо високий відсоток обстежених (15-45 % в залежності від групи) має дисбаланс есенціальних металів. Це кореспондується, зокрема, з даними про вміст ВМ в біосубстратах людей з різних країн світу [4-9 та інш.].

Як правило, особливо при хронічній експозиції малими дозами ВМ, перші прояви патологічних зрушень в організмі (здебільшого з боку печінки, нирок, нервової та серцево-судинної систем) мають відстрочений характер, що не дозволяє зв'язати виявлені симптоми з попередньою експозицією ВМ. Широке впровадження в практику визначення концентрації МТ у різних біосубстратах (поряд з традиційним вимірюванням концентрацій металів у крові, сечі та волоссі) дозволяє суттєво знизити ступень невизначеності у діагностиці не тільки металотоксикозів, а й широкого кола таких спадкових і набутих захворювань, в патогенезі яких суттєву роль відіграють дефіцит, надлишок або дисбаланс

ВМ в організмі.

Як свідчать результати проведених нами епідеміологічних та експериментальних досліджень, має місце, з одного боку, високий рівень кореляційних зв'язків між концентраціями цинку і МТ в крові у фізіологічних умовах та, з іншого боку, між ступенем інтоксикації організму кадмієм та ртуттю і концентрацією МТ в крові, сечі та органах лабораторних тварин (наприклад, коефіцієнт кореляції 0,65 між вмістом кадмію і МТ в сечі; 0,66 між вмістом ртуті і МТ в сечі; 0,78 між концентрацією цинку і вмістом МТ в еритроцитах тощо). Це відбиває, на нашу думку, важливу загально біологічну позицію щодо тлумачення таких понять як «металотоксикоз», дісгомеостаз та «носійництво» важких металів. У всіх цих випадках дослідження рівнів МТ у біосубстратах дає важливу інформацію для лікаря профпатолога та токсиколога.

Металотоксикоз – гостре або хронічне отруєння важкими металами з відомими патогенетичними механізмами та характерною клінічною картиною. В сучасних умовах професійні та екологічно зумовлені метало токсикози зустрічаються рідко, здебільше у надзвичайних ситуаціях або в разі порушення вимог охорони праці та поведіння з відповідними речовинами. Визначення МТ в цих випадках доцільне для уточнення важкості патологічного процесу, прогнозу та оцінки ефективності застосованих лікувальних заходів.

Під дисгомеостазом важких металів розуміють підвищення, зниження або порушення співвідношення провідних біологічно значущих (есенціальних) металів з різноманітними функціональними зрушеннями в організмі, що може бути викликано дисбалансом надходження, утилізації та виведення токсичних та есенціальних важких металів. Такі стани можуть мати первинний або вторинний характер та проявляються неспецифічними симптомами (підвищення стомлюваності, зниження

загальної та імунологічної резистентності, дерматологічні проблеми тощо) та розвиваються на протязі тривалого часу. Оскільки діагностика таких станів досить важка, важливими заходами в їх виявленні є сумісне дослідження вмісту важких металів та МТ у біосубстратах таких осіб.

Щодо «носійництва» ВМ, то під таким зазвичай в токсикології розуміють виявлення в крові, сечі та інших біосубстратах підвищеного рівню окремих конкретних металів, що не супроводжується будь якими симптомами, функціональними зрушеннями та іншими проявами метало токсикозу чи дисгемостаза. Випадки носійництва виявляються, як правило, при проведенні планових або моніторингових лабораторних досліджень. Визначення МТ у таких осіб дозволяє диференціювати носійництво від отруєння ВМ.

Наш багаторічний досвід моніторингових та епідеміологічних досліджень різних контингентів здорового населення, а також хворих з підозрою на отруєння ВМ, свідчить, що найбільш часто зустрічаються випадки дисгемостаза (до 27 % відсотків обстежених), тоді як ознаки інтоксикації МВ виявляли на рівні 0,07-0,1 %. За 15 років спостережень носійництво спостерігали у 12 випадках: перевищення вмісту ртуті вище за токсикологічну норму (50,0 мкг/дм<sup>3</sup>) спостерігалось нами 5 разів, з них 3 – експоновані моряки, а вище рекомендованої ВООЗ норми (25,0 мкг/дм<sup>3</sup>) – 18 разів. За весь час досліджень тільки 4 рази в крові було виявлено підвищений вміст кадмію (вище 10,0 мкг/дм<sup>3</sup>), 2 рази - талію, один раз - свинцю (вище 150 мкг/дм<sup>3</sup>).

Наші експериментальні дослідження показують, що індукція синтезу МТ при дії багатьох ВМ (в першу чергу кадмію, ртуті та цинку) носить стійкий і досить тривалий характер[10]. Цей факт є дуже важливим, оскільки низькодозова експозиція ВМ, як правило,

не призводить до стрімкого розвитку металотоксикозу, який може бути діагностовано за клінічними ознаками. На відміну від останнього низькодозова експозиція ВМ призводить, перш за все, до зниження імунної реактивності [11, 12] та адаптаційних резервів організму. Токсична дія низьких доз ВМ носить відстрочений характер і може маніфестувати себе клінічними ознаками через досить тривалий час після дії металу. Вміст МТ в біосубстратах може бути високочутливим специфічним маркером експозиції токсичними ВМ (ТВМ). Цьому сприяє, як було показано в наших дослідженнях, статистично значуще дозозалежне зростання інтегральної концентрації МТ (тобто суми всіх ізоформ) в плазмі (сироватці) крові, що спостерігається вже через добу після експозиції цинком, кадмієм, або ртуттю. Цей показник у поєднанні з визначенням концентрації металів в крові і сечі дозволяє достовірно діагностувати експозицію токсичними ВМ. І хоча концентрація ТВМ в крові швидко знижується з часом, метал залишається в організмі в органах мішенях (печінці, нирках, нервовій системі) і може продовжувати свою токсичну дію. Підвищена концентрація МТ в плазмі (сироватці) крові, як правило, зберігається довше, ніж підвищена концентрація метала-токсиканта, тому може використовуватися як ефективний і чутливий біомаркер експозиції через декілька тижнів, коли концентрація важкого металу в крові вже знаходиться нижче МДР і діагностувати металотоксикоз за цим показником неможливо.

Оскільки МТ відіграє надзвичайно важливу роль в обміні та забезпеченні біодоступності цинку, зниження рівня МТ в еритроцитах крові нижче за середньо популяційний рівень на 50 % і більше свідчить про цинкдефіцитний стан, навіть в тому випадку, якщо концентрація цинку в крові укладається в межі фізіологічної норми. Оскільки синтез МТ в еритроцитах відбувається

на стадії еритропоезу, вміст МТ в еритроцитах відбиває інтегральну забезпеченість цинком, а не локальну за часом концентрацію в крові, яка швидко змінюється (наприклад, різко зростає при введенні цинквміщуючих мінеральних препаратів і швидко знижується завдяки детоксикаційній функції печінки).

Вміст МТ в сечі носить дозозалежний характер, наприклад, від рівню кадмію в нирках. Концентрація МТ в сечі вище за 0,1 мг/л свідчить про початок ниркової дисфункції, частіше за все тубулоінтерстиціального синдрому. Через малий розмір МТ його поява в сечі передує вираженій протеїнурії.

Все вищевикладене стало основою для уточнення нормативних величин вмісту МТ у біосубстратах здорової людини, а також розробки алгоритму щодо порядку проведення досліджень.

Аналіз численних публікацій показав, що різні автори наводять в своїх роботах величини вмісту МТ в біосубстратах людини, які навіть при відсутності експозиції ВМ характеризуються високими розбіжностями, що утруднює встановлення біологічної норми. Вірогідно, не випадкова відсутність прийнятих нормативів ВООЗ. Проведені нами моніторингові дослідження можуть стати відправною точкою для аргументації національних нормативів цього плану. Запропоновані граничні рівні вмісту МТ в біосубстратах людини підсу-

мовані в табл. 1.

Ці данні дозволяють орієнтуватися при інтерпретації результатів досліджень, які проводяться з метою моніторингу контингентів підвищеного ризику експозиції ВМ, виявленні наслідки виробничо-зумовленого контакту, а також у роботі з хворими для виявлення ознак дисгомеостазу металів.

Наші пропозиції щодо нормативних рівнів вмісту МТ у біосубстратах людини, а також досвід лабораторного обстеження різних контингентів населення дозволили виділити контингенти серед яких доцільно проводити дослідження щодо встановлення рівнів ТВМ та ВМ у профілактичних та діагностичних цілях. До таких, за нашим досвідом, належать:

1. особи з професійно-обумовленим контактом:

- при планових оглядах в тому випадку, якщо виявлені ознаки загальних захворювань або функціональних порушень,
- при звертанні за медичною допомогою при загальних захворюваннях осіб, в анамнезі яких був професійно-зумовлений контакт з ВМ.
- У осіб з окремими симптомами, характерними для металотоксикозів (отруєнь ВМ)

2. населення, що проживає в районах екологічно небезпечних за ВМ (особли-

Таблиця 1

Граничні рівні вмісту МТ в біосубстратах

Рівень експозиції металом (Zn, Cd, Hg)	Біосубстрат			
	Еритроцити	Плазма (сироватка)	Сеча	
	мкг/г білку	нг/г білку	мкг/л	мкг/г креатиніну
Норма	40-100	< 15	< 100	< 100
Виробнича експозиція Zn, Cd, Hg	130-350	20-100	900-1300	1500-2100
Цинкдефіцитний стан	< 30	< 15	< 100	< 100

во діти та вагітні жінки)

3. Контингенти хворих з дисгомеостазом есенціальних металів (перш за все, цинку).

Для таких досліджень було розроблено алгоритм і показання для вибору відповідного біосубстрата для аналізу:

Ми пропонуємо наступний алгоритм такого дослідження:

1. Якщо мав місце контакт з важкими металами (Cd, Zn, Hg), підтверджений виміром їх вмісту в повітрі, їжі, воді тощо (або зі слів пацієнта) і пацієнт звернувся до лікаря не пізніше 3 діб після контакту, або якщо є симптоми отруєння ВМ — вимірюється вміст ТВМ у крові та сечі і МТ в сироватці крові. Перевищення максимально допустимого рівня ТВМ або наближення до нього (75% і більше) (табл. 2.) при рівні МТ в сироватці крові вище 15 нг/г білка свідчить про наявність експозиції і є свідченням того, що отримана доза була діючою, викликавши адаптаційний синтез МТ. Крім того, бажано визначити вміст базових есенціальних металів (Zn, Fe, Cu, Mn), для прогнозування важкості перебігу металотоксикозу. Дисбаланс есенціальних металів є несприятливою прогностичною ознакою.

2. Якщо після контакту пройшло більше 3 діб, аналіз крові на ТВМ, як правило, не інформативний. В такому випадку необхідно провести вимірювання концентрації ТВМ в сечі (при часу після контакту до 10 діб) та визначення вмісту МТ в сироватці крові та еритро-

цитах. Рівні МТ в сироватці вище 15 нг/г білка і еритроцитах вище 100 мкг/г білка при концентрації Cd, Zn, Hg в сечі в межах 75% МДУ і вище є свідченням експозиції ТВМ.

3. При підозрі на хронічну дію сполук Cd, Zn, Hg необхідно проаналізувати вміст ТВМ в волоссі і концентрацію МТ в еритроцитах та сечі. Концентрація МТ в еритроцитах вище 100 мкг/г білка при концентрації в волоссі 75% МДУ і вище вказує на наявність експозиції. Концентрація МТ в сечі вище 100 мкг/г креатиніну свідчить про початкову стадію ниркової дисфункції. Оскільки в нормі МТ з сечею не виводиться, поява цього низкомолекулярного білка свідчить про порушення реабсорбції білка, яке передує вираженій протеїнурії.

4. При наявності симптомів, характерних для недостатності цинку, необхідно визначити вміст МТ в еритроцитах та концентрацію цинку в крові. Концентрація МТ в еритроцитах менше 30 мкг/г білку свідчить про недостатність біодоступного цинку навіть при концентрації Zn в крові на нижній межі умовної фізіологічної норми (< 1,5 мг/дм<sup>3</sup>) і потребує корекції.

#### Висновок:

Запропонований алгоритм дає змогу мінімізувати кількість необхідних досліджень і підвищити якість діагностики станів, пов'язаних з експозицією ВМ або порушенням їх обміну.

Таблиця 2

Норми або максимально допустимі рівні вмісту цинку, кадмію, ртуті та міді в біосубстратах.

Метал	Концентрація в біосубстраті		
	Кров, мг/дм <sup>3</sup>	Сеча, мг/дм <sup>3</sup>	Волосся, мкг/г
Цинк	1,16 - 9,0	0,2 - 0,4	120-150
Кадмій	< 0,01	<0,002	<0,4
Ртуть	< 0,050 (0,025)	< 0,025 (0,010)	< 0,7
Мідь	0,7 – 1,4	< 0,030	8,0-20,0

### Литература

1. Occupational Health for All. Biological Monitoring of Chemical Exposure in the Workplace /Ed. by M.I. Mikheev. Chapter 3.4. K.H. Schaller. Inorganic mercury. – Geneva: WHO, 1996. – Vol. 1. – P. 132-155.
2. Шафран Л.М. Металлотионеины / Шафран Л.М., Пыхтеева Е.Г., Большой Д.В. Под редакцией проф. Л.М. Шафрана – Одесса: Издательство “Чорномор’я”, 2011. – 428 с.
3. Ngu T.T. Metalation of metallothioneins./ T. T. Ngu, M.J. Stillman//IUBMB-2009. – Vol. 61(4) – P. 438-446.
4. Metallothioneins and related chelators. Metal ions in life sciences, v. 5./ Astrid Sigel; Helmut Sigel; Roland K O Sigel/ / Cambridge, UK : RSC Publishing, 2009, 514 p.
5. Bourassa M.W. Metal imaging in neurodegenerative diseases. / M.W. Bourassa, L.M.Miller // Metallomics/ : integrated biometal science. – 2012. - № 4(8). P. 721-738. doi:10.1039/c2mt20052j.
6. Prevalence and predictors of exposure to multiple metals in preschool children from Montevideo, Uruguay. / Kordas K., Queirolo E.I., Ettinger A.S., [et al.] // The Science of the total environment. – 2010. - № 408(20). – P. 4488-4494. doi:10.1016/j.scitotenv.2010.06.041.
7. Аккумуляция тяжелых металлов и микроэлементов в волосах населения оренбургской области / А.В. Скальный, Е.В. Сальникова, Е.А. Кудрявцева [и др.] //Микроэлементы в медицине – 2012. – Vol.13 (4). P. 42-45
8. Определение тяжелых металлов в волосах человека методами дифференциальной импульсной полярографии и рентгеновской флуоресцентной спектроскопии. / Джапаридзе Дж.И., Шавгулидзе Н.В., Хавтаси Н.С.[и др.] // Український журнал з проблем медицини праці. - 2008. - № 2 (14). – С. 58-62.
9. Алибаева Б.Н., Омарова А.С., Демченко Г.А., Цицулин В.И., Курасова Л.А., Есдаулет Б.К., Адамбекова М.Р. Состояние здоровья населения мегаполиса в зависимости от экологии г. Алматы // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2013. – № 11 – С. 155-159
10. 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. 60-64.
11. Dudasova S, Grancicova E. Influence of casein and soy flour proteins on amino acid content in the liver of experimental animals. *Physiol Res.* – 1992. - Vol. 41, № 6. – P. 411-416
12. Дмитруха Н.М. Імунотоксична дія свинцю і кадмію як гігієнічна проблема (до патогенезу, діагностики та профілактики інтоксикацій важкими металами). 14.02.01 – гігієна та професійна патологія. Автореферат дисертації ... доктора біологічних наук, Київ– 2010, 42 С.

### Referenses

1. Occupational Health for All. Biological Monitoring of Chemical Exposure in the Workplace / Ed. by M.I. Mikheev. Chapter 3.4. K.H. Schaller. Inorganic mercury. - Geneva: WHO, 1996. - Vol. 1. - P. 132-155.
2. Shafran L.M. Metallothioneins / L.M.Shafran, E.G.Pyhteeva, D.V.Bolshoy.. Edited by prof. Shafran L.M. - Odessa: Publishing “Chornomor’ya”, 2011. - 428 p. (in Russian)
3. Ngu T. T. Metalation of metallothioneins. / T.T. Ngu, M.J. Stillman // IUBMB - 2009. - Vol. 61 (4) - P. 438-446.
4. Metallothioneins and related chelators. Metal ions in life sciences, v. 5. / Astrid Sigel; Helmut Sigel; Roland KO Sigel / / Cambridge, UK: RSC Publishing, 2009, 514 p.
5. Bourassa M.W. Metal imaging in neurodegenerative diseases. / M.W. Bourassa, L.M. Miller // Metallomics: integrated biometal science. - 2012. - № 4 (8). R. 721-738. doi: 10.1039 / c2mt20052j.
6. Prevalence and predictors of exposure to multiple metals in preschool children from Montevideo, Uruguay. / Kordas K., Queirolo EI, Ettinger AS, [et al.] // The Science of the total environment. - 2010. - № 408 (20). - R. 4488-4494. doi: 10.1016 / j.scitotenv.2010.06.041.
7. Accumulation of heavy metals and trace elements in the hair of the population of the Orenburg region / AV Rock, EV

- Salnikov, EA Kudryavtseva [et al.] // Trace Elements in Medicine - 2012. - Vol.13 (4). R. 42-45
8. Determination of heavy metals in human hair by differential pulse polarography and X-ray fluorescence spectroscopy. / JI Japaridze, Shavgulidze NV, NS Khavtasi [et al.] // Ukrainian Journal of Occupational Medicine problems. - 2008. - № 2 (14). - P. 58-62.
  9. Alibayeva BN, Omarova AS, Demchenko GA, Tsitsurin VI, Kurasova LA, Esdaulet BK, MR Adambekova The health status of the population metropolis depending on the ecology of Almaty // International Journal of applied and fundamental research. - 2013. - № 11 - P. 155-159 (in Russian)
  10. Shafran L.M. Metallothionein as a biomarker in experiment and clinic / L.M.Shafran, E.G.Pyhteeva, D.V.Bolshoy. // Questions of biological, medical and pharmaceutical chemistry. - 2011. - № 9. - S. 60-64. (in Russian)
  11. Dudasova S, Grancicova E. Influence of casein and soy flour proteins on amino acid content in the liver of experimental animals. Physiol Res. - 1992. - Vol. 41, № 6. - P. 411-416
  12. Dmytrukh NM Immunotoxic effect of lead and cadmium as a hygienic problem (in the pathogenesis, diagnosis and prevention of poisoning by heavy metals). 14.02.01 - hygiene and occupational pathology. Thesis ... Doctor of Biological Sciences, Kyiv-2010, 42 S. (in Ukrainian)

### Резюме

#### АЛГОРИТМ ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ ПРИ ПОДОЗРЕНИИ НА ДИСГОМЕОСТАЗ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

*Шафран Л.М., Пыхтеева Е.Г., Большой Д.В.*

Предложен алгоритм лабораторных исследований при подозрении на дисгомеостаз тяжелых металлов (недостаточность уровней эссенциальных элементов или металлотоксикоз), который содержит рекомендации по выбору оптимального биосубстрата в зависимости от времени действия и дозы ксенобиотика.

**Ключевые слова:** *тяжелые металлы, металлотионеин, интоксикация, цинк-дефицит*

### Summary

#### LABORATORY ALGORITHM FOR SUSPECTED HEAVY METALS DISHOMEOSTASIS

*Shafran L.M., Pykhiteeva E.G., Bolshoy D.V.*

The laboratory algorithm for suspected heavy metals dishomeostasis (insufficient levels of essential elements or metallotoxicosis) is proposed. It contains guidelines for choosing the optimal biosubstrate depending on the time of action and dose. It contains recommendations for choosing optimal biosubstrate depending on the action time and dose of xenobiotic.

**Keywords:** *heavy metals, metallothionein, intoxication, insufficient of zinc levels*

*Впервые поступила в редакцию 25.10.2014 г. Рекомендована к печати на заседании редакционной коллегии после рецензирования*