

ИНФРАКРАСНЫЙ СПЕКТРАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СЫВОРОТКИ КРОВИ КАК ОТРАЖЕНИЕ УРОВНЯ НАРУШЕНИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ ПРИ ИНФЕКЦИОННОЙ ПАТОЛОГИИ У ДЕТЕЙ

УДК 616—053.3/073.584:616.9+15

Поступила 27.04.2009 г.



В.В. Краснов*, д.м.н., профессор, зав. кафедрой детских инфекционных болезней;
А.С. Гордецов, д.х.н., профессор, зав. кафедрой общей химии

Нижегородская государственная медицинская академия, Н. Новгород

English

Infrared spectral analysis of a blood serum as a reflection of the metabolic process disturbance level at infectious pathology in children

V.V. Krasnov, MD, professor, head of the infantile infectious disease chair;

A.S. Gordetsov, ChD, professor, head of the general chemistry chair

Nizhny Novgorod state medical academy, N. Novgorod;

The aim of work is a detection of the IR-spectroscopic analysis integrative value correlation with a toxicosis expression degree, stipulated by the metabolic disturbance level.

Materials and methods. 183 children with different clinical variants of diphtheria, angina, infectious mononucleosis and 30 healthy children at the age of 1 to 14 years were observed. The dried blood serum, prepared for the IR-spectral analysis, was investigated.

Results and discussion. The differences of the spectral analysis conventional mathematical symbol (parameter) numerical meanings at different diseases in children depending on a degree of intoxication expression, characteristic of each disease, as well as on their meanings in healthy children, are revealed. Besides, the substantial differences of numerical meanings are marked at different outcomes of the diphtheria critical forms (the survived and died children). A correlation between the blood serum IR-spectral analysis alterations and a metabolism disturbance level at infectious pathology, defined by the intoxication expression degree, is revealed. It is presumed, that the blood serum IR-spectra reflect a level of metabolic disturbances in the organism, appearing under the influence of infectious agent. These alterations are not specific for any separate disease and reflect the common regularities of the infectious process pathogenesis.

Key words: infrared spectral analysis, blood serum, infectious diseases, syndrome of angina, metabolism disturbance.

В основе спектроскопических методов лежит измерение зависимости интенсивности поглощения, испускания или рассеяния света веществом от частоты света (или длины волны). В оптической спектроскопии используются спектры поглощения в инфракрасной и ультрафиолетовой областях, а также спектры комбинационного рассеяния света и спектры люминесценции. Каждому спектру соответствует определенная область длин волн. В разных областях поглощение света имеет различную природу. При поглощении энергии в пределах оптического спектра может изменяться вращательная, колебательная энергия молекулы или энергия возбуждения внешних, валентных электронов. Для

повышения вращательной энергии молекулы достаточны относительно небольшие энергии — соответствующее поглощение лежит в далекой инфракрасной (ИК) области (области больших длин волн). Для увеличения колебательной энергии молекулы (для возбуждения колебаний атомов относительно друг друга) требуются кванты большой величины, и их поглощение лежит в близкой ИК-области. Еще большие кванты энергии требуются для возбуждения внешних электронов молекулы — поглощение в видимой и УФ-области.

Метод спектроскопического анализа позволяет определить количество того или иного вещества. Закон Бера — один из основополагающих законов

*Краснов Виктор Валентинович, тел. раб. 8(831) 242-11-08, e-mail: dr.krasnov@mail.ru

спектроскопии — гласит: поглощение света пропорционально числу молекул поглощающего вещества на его пути.

В ИК-спектре различают четыре области: 1) видимая, 2) близкая, 3) фундаментальная и 4) далекая. Для исследования органических веществ наибольшее значение имеет фундаментальная инфракрасная область, лежащая в диапазоне от 200 до 5000 см^{-1} . Полосы поглощения в области 600—1300 см^{-1} отличны и специфичны даже для родственных молекул, поэтому его называют областью «отпечатков пальцев» молекулы. В эту область попадают валентные колебания одинарных связей C-O, C-N, N-O, P-O. Напротив, частоты поглощения двойных связей C=C, C=O, N=O являются характеристическими, т.е. мало отличаются для разных молекул и лежат в диапазоне 1500—1950 см^{-1} . Поглощение тройных связей находится в еще более коротковолновой области (для C≡C в диапазоне 2100—2250 см^{-1}). ИК-спектр является абсолютно специфическим свойством каждого химического соединения, поэтому даже изомеры положения, геометрические изомеры и молекулы, содержащие протоны, обладают различными спектрами. Таким образом, ИК-спектр каждого вещества имеет отчетливую индивидуальность (fingerprint).

ИК-спектры применяются для идентификации соединений и установления степени их чистоты (качественно), а также для качественного анализа смесей при контроле динамики реакции. Однако наиболее распространенное и важное применение ИК-спектров — это выяснение и подтверждение предполагаемого строения органических соединений. Наличие почти любой функциональной группы в молекуле можно установить с их помощью. Кроме того, уже упоминалось о возможности проведения и количественного ИК-спектроскопического анализа.

Современные приборы «записывают» спектр автоматически, а классические ИК-спектрофотометры типа «Specord 80/85 IR», а также современные фурье-спектрофотометры обеспечивают фотометрическую точность $\pm 0,2\%$ и выше. Контрольная программа встроенного компьютера не допускает неправильных и несовместимых параметров, обеспечивает графическое построение и линейную корреляцию базисной линии между 10 волновыми числами. Перечисленные факторы обеспечивают объективность и высокую точность спектроскопических анализов.

Согласно современным представлениям, основу клеточной мембраны составляет двойной слой фосфолипидов, обуславливающий присутствие мембране свойства жидкого кристалла. Нарушения структуры и функции клеточных мембран на всех этапах болезни являются главным выражением патологии при состояниях, сопровождающихся токсикозом. Роль патологии клеточных мембран и метаболизма, как составных звеньев токсикоза, отражена в большом количестве работ. Как известно, генерализованные

расстройства микроциркуляции, присущие патогенезу заболеваний, протекающих с токсикозом, являются причиной гипоксии. Нарастающая тканевая гипоксия приводит к изменению межклеточного вещества и клеточных мембран. В свою очередь, в механизмах развития патологии мембран ведущее место отводится гипоксическим нарушениям метаболизма клеток. В результате чрезмерное накопление кининов, биогенных аминов, протеаз и липаз, лизосомальных гидролаз, продуктов перекисного окисления липидов, свободных жирных кислот, а также патологических миокардио-депрессивных веществ формирует циркуляторную недостаточность. Такое накопление определяет синдром токсемии и вызывает повреждение практически всех функций и систем, включая сократимость миокарда, тонус сосудов, реологические свойства крови и т.д. В конечном итоге тканевая гипоксия нарушает пути биологического окисления. Страдают цикл Кребса и окисление глюкозы в системе пентозного шунта. Основным путем получения энергии становится анаэробный гликолиз с образованием молочной кислоты как конечного продукта. Лактатацидоз, стимулируя накопление НАДН, тормозит ферменты гликолиза (фосфоорилаза, фосфофруктокиназа) и снижает активность этого пути окисления, возникает тяжелый энергодефицит с истощением запасов макроэргов.

Одним из следствий дефицита энергии является накопление ионов и молекулярных частиц (OH^- , H^+ , HOO^+ и др.), которые приводят к окислительному повреждению полиненасыщенных жирных кислот, входящих в состав липидов мембран [1,—3]. Перекиси липидов, в свою очередь, оказывают свое разрушительное действие и на основные макроэргические соединения АТФ, подвергающегося усиленному распаду до АДФ, АМФ и аденозина.

Существующий уровень знаний в области ИК-спектроскопии позволяет определять появление новых («патологических») и исчезновение «нормальных» химических веществ (АТФ, ГТФ, УТФ и др.), которые при различных патологических состояниях подвергаются быстрому метаболизму с образованием соответствующих продуктов гидролиза — монофосфатов. Также возможно определение динамики изменения интенсивности полос поглощения белковых молекул и фосфатидов в процессе распада клеточных структур. В исследуемую зону ИК-спектра попадают и валентные связи свободных радикалов.

Таким образом, ИК-спектроскопия позволяет определить совокупный уровень ряда метаболитов, образующихся в процессе патологических изменений, инициированных токсикозом, и, соответственно, оценить степень нарушения метаболических процессов.

На наш взгляд, наиболее важным является определение не количества того или иного вещества (учитывая огромное их количество), находящегося в крови больного ребенка, а корреляции интегра-

тивных показателей ИК-спектров биологических жидкостей и тканей (в частности, сыворотки крови) со степенью выраженности токсикоза и, следовательно, уровнем метаболических нарушений.

Цель работы — определить корреляцию интегративных показателей ИК-спектроскопического анализа со степенью выраженности токсикоза, обусловленной уровнем метаболических нарушений.

Материалы и методы. В процессе исследования под наблюдением находилось 183 ребенка в возрасте от 1 года до 14 лет с различной инфекционной патологией. У 113 детей диагностирована токсическая дифтерия ротоглотки (ТДР), у 14 — локализованная дифтерия ротоглотки (ЛДР), у 44 — ангина (фолликулярная или лакунарная) и у 12 — инфекционный мононуклеоз (ИМН). Для сравнения была взята группа здоровых детей ($n=30$). По возрастному и половому составу все группы соответствовали друг другу.

В качестве субстрата для исследования использовали сыворотку крови, приготовленную для проведения спектрального анализа. Сыворотку высушивали при комнатной температуре в чашке Петри. Сухой остаток вводили в вазелиновое масло и получали суспензию, которую затем подвергали ИК-спектроскопии с регистрацией спектров поглощения в диапазоне $1000—1200\text{ см}^{-1}$. При получении спектрограммы определяли высоту пиков полос поглощения с максимумами при 1170, 1165, 1150, 1140, 1130, 1100, 1070, 1025 см^{-1} и вычисляли среднее значение высоты всех пиков C . Затем определяли отношение высоты каждого предыдущего пика к последующему: $1170/1165$, $1165/1150$, $1150/1140$, $1140/1130$, $1130/1100$, $1100/1070$, $1070/1025$. Информативные показатели обозначали условными символами (M , m , D , c , R , x , S). Показатель M представляет собой наибольшее полученное частное, а m — наименьшее. Кроме того, был введен дополнительный показатель D , являющийся разностью M и m . Среднее значение всех частных от деления обозначали c . Также вычисляли величину R — отношение высоты пика с максимумом при 1165 см^{-1} к высоте пика с максимумом при 1170 см^{-1} , величину x — отношение высоты пика с максимумом при 1130

см^{-1} к среднему значению величины высот пиков C и величину S — отношение высоты пика с максимумом при 1100 см^{-1} к среднему значению величины высот пиков C .

Результаты и обсуждение. Первоначально было проведено сравнение показателей ИК-спектроскопического анализа сыворотки крови здоровых детей и детей с различной инфекционной патологией, протекающей с синдромом ангины (табл. 1). Если рассматривать приведенные нозологические формы применительно к степени выраженности интоксикации, то следует согласиться, что наименее выраженный токсический синдром должен наблюдаться при ЛДР. Далее, по мере возрастания уровня интоксикации, заболевания располагаются в следующем порядке: ИМН, ангины и ТДР. Такая градация обусловлена клинико-патогенетическими сведениями о каждом из заболеваний. Конечно, у отдельно взятого больного с ИМН уровень интоксикации может быть более выраженным, чем у конкретного больного ангиной, но у группы больных степень выраженности всех симптомов и синдромов усредняется. Соответственно у здоровых детей синдром интоксикации отсутствует. Известно, что нарушение метаболических процессов в организме нарастает по мере углубления токсикоза и эти две переменные величины имеют четкую положительную корреляционную взаимосвязь.

По данным таблицы прослеживается тенденция постепенного снижения числовых значений показателя M по мере возникновения и нарастания токсикоза (от здоровых детей к ТДР). Обратная, более четко выраженная тенденция (увеличение числового значения параметра) отмечается у показателей S и x . Предположительно названные параметры (S , x и в меньшей степени M) отражают уровень изменения метаболических процессов, находящийся во взаимосвязи со степенью интоксикации.

Кроме того, из табл. 1 видно, что при ТДР и ангинах показатели ИК-спектроскопии имеют сходные значения, аналогичная ситуация отмечается при ЛДР и ИМН, а ведь именно в таком порядке заболевания более сопоставимы по степени выраженности интоксикации.

S целью выяснения нормальных значений

Т а б л и ц а 1

Показатели ИК-спектроскопии у здоровых детей и при различных инфекционных заболеваниях, протекающих с синдромом ангины ($M \pm m$)

Нозологическая форма	Показатели ИК-спектроскопии						
	M	m	c	D	S	R	x
Здоровые дети	$1,8 \pm 0,074$	$0,5 \pm 0,019$		$1,4 \pm 0,086$	$0,6 \pm 0,015$	$0,6 \pm 0,023$	$0,7 \pm 0,019$
ЛДР	$1,6 \pm 0,196$	$0,3 \pm 0,046$	$1,0 \pm 0,099$	$1,3 \pm 0,24$	$0,8 \pm 0,086$	$0,3 \pm 0,071$	$0,8 \pm 0,044$
ИМН	$1,9 \pm 0,333$	$0,3 \pm 0,066$	$1,0 \pm 0,066$	$1,6 \pm 0,394$	$0,8 \pm 0,068$	$0,4 \pm 0,081$	$0,8 \pm 0,069$
Ангини	$1,3 \pm 0,052$	$0,5 \pm 0,020$	$0,9 \pm 0,026$	$0,8 \pm 0,064$	$1,1 \pm 0,052$	$0,6 \pm 0,045$	$0,9 \pm 0,044$
ТДР	$1,4 \pm 0,053$	$0,5 \pm 0,017$	$0,9 \pm 0,023$	$0,9 \pm 0,064$	$1,1 \pm 0,026$	$0,6 \pm 0,029$	$0,9 \pm 0,022$

Т а б л и ц а 2

Наименьшее и наибольшее числовые значения параметров ИК-спектроскопии у здоровых детей

Значение	Показатель ИК- спектроскопии					
	D	M	m	R	S	x
Min	0,55	1,23	0,30	0,43	0,50	0,45
Max	2,50	2,88	0,70	0,88	0,80	0,86

ИК-спектроскопических параметров был определен их диапазон у здоровых детей. Для этого выбрали минимальное и максимальное значение каждого из показателей (табл. 2). Затем определили количество детей (в %) при каждой нозологической форме, у которых числовые значения параметров (минимальные и максимальные) выходят за пределы принятой нормы (табл. 3). В случае, если числовые значения ИК-спектроскопических параметров ребенка будут выходить за значения, приведенные в табл. 2, мы можем с уверенностью отнести его к группе больных, так как у здоровых такие числовые значения не зафиксированы.

Как видно из табл. 3, показатели *D*, *M*, *m* и *R* при возникновении инфекционного заболевания имеют тенденцию к снижению (у больных преимущественно располагаются ниже *min*), а *S* и *x*, наоборот, преимущественно повышаются по отношению к норме (преимущественно выше *max*). Как уже отмечалось выше, тенденции поведения ИК-параметров сходны при ТДР и ангине, с одной стороны, и при ЛДР и инфекционном мононуклеозе, с другой. Находит подтверждение и другая замеченная тенденция — увеличение количества больных с повышенными значениями параметров *S* и *x* по мере увеличения уровня интоксикации ($p < 0,05—0,01$). Имеется и некоторая тенденция увеличения количества больных с пониженным значением показателя *M*: с 28,6% при ЛДР до 40,8—45,5% при ТДР и ангинах. Выявленная взаимосвязь изменений числовых значений параметров ИК-спектроскопии и выраженности интоксикации, присущей тому или иному инфекционному заболеванию, позволяет сделать вывод, что данный анализ является интегральным показателем, отражающим уровень нарушения метаболизма.

Однако, безусловно, необходимо более подроб-

Т а б л и ц а 3

Число детей (в %), имеющих отклонение от нормальных значений показателей ИК-спектроскопии, при инфекционных заболеваниях, протекающих с синдромом ангины

Нозологическая форма	Минимальные показатели						Максимальные показатели					
	$D < 0,55$	$M < 1,23$	$m < 0,30$	$R < 0,43$	$S < 0,50$	$x < 0,45$	$D > 2,50$	$M > 2,88$	$m > 0,70$	$R > 0,88$	$S > 0,80$	$x > 0,86$
Синдром ангины (все больные)		40,5	23,7	28,4	4,2	6,7		2,6	4,7	10,0	69,5	68,9
ЛДР		28,6	57,1	64,3	14,3	0,0		7,1	0,0	7,1	50,0	35,7
ИМН		33,3	58,3	58,3	8,3	8,3		25,0	0,0	0,0	50,0	41,7
Ангины		45,5	9,1	22,7	6,8	11,5		0,0	4,5	18,2	79,5	59,1
ТДР	30,8	40,8	21,7	23,3	1,7	3,3	0,8	0,8	5,8	8,3	80,8	68,3

П р и м е ч а н и е: в первой строчке (все больные) основную массу составляют дети с ТДР и ангинами.

Т а б л и ц а 4

Показатели ИК-спектроскопии при различных формах токсической дифтерии у детей ($M \pm m$)

Клинический вариант ТДР	Показатели ИК-спектроскопии						
	M	m	c	D	S	R	x
Субтоксическая	1,3±0,063	0,5±0,028	0,9±0,035	0,8±0,080	1,2±0,041	0,7±0,062	1,0±0,039
Токсическая I степени	1,5±0,114	0,5±0,034	0,9±0,037	1,0±0,142	1,1±0,061	0,7±0,059	1,0±0,039
Токсическая II степени	1,4±0,182	0,6±0,026	0,9±0,078	0,8±0,207	1,2±0,047	0,6±0,043	1,0±0,033
Токсическая III степени	1,4±0,060	0,4±0,036	0,9±0,031	1,1±0,088	1,0±0,053	0,5±0,050	0,8±0,050

Таблица 5

Показатели ИК-спектроскопии в зависимости от исхода токсической дифтерии у детей ($M \pm m$)

Исход ТДР	Показатели ИК-спектроскопии						
	M	m	c	D	S	R	x
Выжившие	1,33±0,06	0,52±0,02	0,85±0,03	0,82±0,07	1,15±0,03	0,65±0,03	0,98±0,02
Умершие	1,72±0,04	0,23±0,03	1,06±0,03	1,47±0,06	0,91±0,07	0,34±0,07	0,72±0,08
p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,01	<0,01	<0,001	<0,01

но рассмотреть поведение параметров ИК-спектроскопии при ТДР. При сравнении числовых значений параметров ИК-спектроскопии при различных клинических вариантах ТДР (табл. 4) видно, что числовые значения мало отличаются.

Данный факт можно объяснить тем, что степень ТДР выставляется на основании формального признака — выраженности отека подкожной клетчатки шеи и не всегда соответствует истинной тяжести патологического процесса. В связи с этим целесообразно рассмотреть числовые значения показателей в зависимости от исхода ТДР (табл. 5).

Как показывает таблица, определяется достоверное различие числовых значений параметров ИК-спектроскопии у выживших и умерших детей.

Проведенный корреляционный анализ показателей ИК-спектроскопии у детей с ТДР выявил, что если показатель *c* по мере ухудшения прогноза растет, то показатели *m* и *x* снижаются при возможности летального исхода. Тенденцию показателя *c* в несколько меньшей корреляционной зависимости повторяет максимальное значение *M*. Уровень корреляции этих показателей достоверен ($p < 0,05$ — $0,001$). Показатели *S* и *R* повторяют тенденцию минимального значения *m* и *x*. В данном случае корреляция параметров ИК-спектроскопии с исходом болезни показывает их поведение по мере нараста-

ния степени токсикоза, но уже внутри группы больных с ТДР.

Таким образом, изменение числовых значений параметров ИК-спектроскопии при ТДР подтверждает вывод, что они отражают степень выраженности токсикоза, а, следовательно, уровень нарушения метаболических процессов.

Закключение. Проведенный анализ позволяет предположить, что ИК-спектры сыворотки крови отражают уровень метаболических нарушений в организме, возникающих под воздействием инфекционного агента. Следует предположить, что изменения не являются специфическими для отдельного заболевания, а отражают общие закономерности патогенеза инфекционного процесса.

Литература

1. Владимирова Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М: Наука; 1972; 179 с.
2. Меерсон Ф.З. и др. Роль ПОЛ в патогенезе ишемического повреждения и антиоксидантная защита сердца. Кардиология 1982; 2: 81—92.
3. Папаян А.В., Цыбульский Э.К. Острые токсикозы в раннем детском возрасте. Л: Медицина; 1984; 232 с.