МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

РЕНТГЕНОСТРУКТУРНЫЙ И РЕНТГЕНОСПЕКТРАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ФАЦИЙ СЫВОРОТКИ КРОВИ В ДИАГНОСТИКЕ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Карпунина Н.С.[1*], *Туев А.В.*[1], *Волынцев А.Б.*[2], *Аминова И.И.*[2]

Пермская государственная медицинская академия имени академика Е.А. Вагнера Росздрава[1], ГОУ ВПО Пермский государственный университет[2], Пермь.

Резюме

Изучены рентгеноструктурные свойства фаций сыворотки крови больных различными формами ИБС, гипертонической болезнью, ХСН с их одновременным рентгеноспектральным анализом. Обследовано 159 человек, средний возраст – 57,2±6,08 года; все участники были разделены на 6 групп: I – пациенты со стенокардией напряжения III ФК – 19 человек; II группа – 10 человек с заживающим инфарктом миокарда; III группа – 19 человек с пароксизмальной рецидивирующей фибрилляцией предсердий; IV группа – 34 пациента с гипертонической болезнью II стадии; V – лица с ХСН ишемического генеза III–IV ФК – 17 человек; в VI группу вошло 30 условно здоровых. Полученные фации подвергали микрофотосъемке в растровом электронном микроскопе S-3400N, спектральный состав исследовали с помощью рентгеновской энергодисперсионной приставки. При расширении периферической зоны с появлением в ней сферических кристаллов в сочетании с шаровидными наплывами и декальцинацией в центре диагностировали стабильную стенокардию, при декристаллизации периферической зоны наряду с расширением центральной, скоплением в ней кристаллов типа бутонов роз и весовым процентом фосфора >0,5% определяли инфаркт миокарда, при отсутствии четкого зонального распределения, увеличении числа радиальных трещин, смещении основной массы кристаллов из центральной зоны в периферическую наряду с весовым процентом углерода >10%, магния <0,01% и кальция < 0,4% в центре, выявляли гипертоническую болезнь. При определении в центральной зоне нескольких центров кристаллообразования, повсеместном отсутствии кальция, наряду с 0,6±0,12 весовых % фосфора в центре диагностировали ПРФП. При сердечной недостаточности центральная часть фации сплошь заполнена кристаллами, периферическая зона содержит единичные солевые включения, в ней максимальна доля углерода (72,0±0,43 весовых %). Фосфор встречается только в центральной зоне, кальций – в обеих зонах. Атеросклероз и ассоциированные с ним клинические состояния входят в список заболеваний, в механизмах формирования которых кристаллизация играет значимую роль.

Ключевые слова: фации сыворотки, рентгеноструктурный и спектральный анализ, сердечно-сосудистые заболевания.

В научных исследованиях и практической медицине значительное внимание уделяется лабораторным методам, облегчающим постановку диагноза и проведение дифференциальной диагностики. При этом наиболее доступным и часто используемым является исследование состава биологических жидкостей (БЖ), в частности крови [1]. Однако современными аналитическими методами не обеспечивается интегральность оценки информации, заложенной в БЖ, так как они позволяют определять лишь количественный состав отдельных метаболитов без качественного анализа взаимосвязей между ними. В то же время, при дегидратации БЖ структурообразование твердой фазы протекает с учетом данных взаимосвязей (помимо физических законов и внешних условий), что позволяет их анализировать. Возможность применения этого метода в медицинских исследованиях обосновали В.Н. Шабалин и С.Н. Шатохина, давшие основные характеристики морфологических структур БЖ, полученные в результате клиновидной дегидратации [4,6]. Возникновение узора трещин в виде центрально-симметричной „ромашки“ в капле сыворотки крови характерно для здоровых людей. При патологических состояниях изменение физических свойств адсорбционного слоя на границе с воздухом в каплях сыворотки может приводить к возникновению дополнительных структур – блях, морщин, листовидных образований, «ковров Серпиньского», «языков Арнольда», различных анизотропных морфотипов и т.д. [4–6]. Хаотичное растрескивание капель при различных заболеваниях, по-видимому, связано с патологическим комплексообразованием, нарушающим гомогенность полимерной пленки [7–9]. Помимо описательной части, авторами совместно с сотрудниками РФЯЦ ВНИИЭФ разработаны подходы к математическому анализу фаций, позволяющие применять статистические методы исследования по отдельным показателям: длине, толщине, углу отклонения трещин и таким обобщенным показателям, как индексы деструкции, релаксации и нарушений [1].

Несмотря на достаточно широкое применение методов оценки твердой фазы БЖ в клинической медицине, благодаря их дешевизне, простоте в исполнении, высокой чувствительности и информативности, существует и ряд проблем. Большая часть исследований находится на стадии феноменологического описания вследствие трудности количественного анализа получаемых образцов, что, в свою очередь, затрудняет статистическую обработку. Высокая степень субъективизма в оценке результатов также не способствует решению данной проблемы. Весомым минусом методов является недостаточная обоснованность механизмов дегидратационной самоорганизации БЖ, поскольку в данном случае особо ценным является не феноменологическое описание типа «вид патологии – наблюдаемые структуры», а анализ обменных процессов, обусловливающих особенности механизмов формирования структуры твердой фазы БЖ.

В этой связи цель настоящего исследования – изучить рентгеноструктурные свойства фаций сыворотки крови больных различными формами ИБС, гипертонической болезнью, хронической сердечной недостаточностью (ХСН) с их одновременным рентгеноспектральным анализом для возможного выявления объективных закономерностей в распределении основных компонентов фаций и взаимосвязей с другими лабораторно-инструментальными параметрами.

Материал и методы

Обследовано 30 условно здоровых людей и 129 пациентов краевой кардиологической клиники, 78 (60,5%) из них – мужчины, средний возраст участников – 57,2±6,08 года. В соответствии с клинико-анамнестическими, а также лабораторно-инструментальными данными (Эхо-кардиография (Эхо-КГ), велоэргометрия (ВЭМ), ЭКГ в покое и длительное мониторирование ЭКГ (ДМ-ЭКГ), суточное мониторирование АД (СМАД), исследование липидного спектра, гемограммы, гемостазиограммы, биохимического анализа крови, уровня тропонинов и proBNP) все обследованные были разделены на 6 групп: I – пациенты со стенокардией напряжения III функционального класса (ФК) – 19 человек; II группа – 10 человек с заживающим инфарктом миокарда; III группа – 19 человек с пароксизмальной рецидивирующей фибрилляцией предсердий (ПРФП); IV группа – 34 пациента с гипертонической болезнью II стадии; V – лица с хронической сердечной недостаточностью (ХСН) ишемического генеза III–IV ФК по NYHA – 17 человек; в VI группу вошло 30 условно здоровых, не имеющих признаков сердечно-сосудистых заболеваний. Группы сопоставимы по возрасту, полу. Забор крови для получения сыворотки осуществляли из кубитальной или подключичной вены в первые сутки пребывания больных в стационаре. Сыворотку центрифугировали в режиме 3 тыс. оборотов в минуту в течение 15 минут. Через 1 час после центрифугирования надосадочную жидкость в объеме 0,004 мл наносили на обезжиренное предметное стекло с алюминиевым напылением. Каплю высушивали методом клиновидной дегидратации в течение 24 часов при комнатной температуре и относительной влажности воздуха 70% с исключением контаминации, после чего полученные фации подвергали микрофотосъемке в растровом электронном микроскопе S-3400N: общий вид фации при увеличении в 30 раз, центральной и краевой части – при увеличении в 300 раз. Критериями для анализа рентгеноструктурной картины фаций служили следующие параметры: разделение фации на центральную, промежуточную и периферическую зоны, их ширину, выраженность и площадь центральной солевой зоны, однородность, расположение и форму кристаллов, целостность контуров фации, наличие маркеров патологии в краевой аморфной и центральной кристаллической зонах.

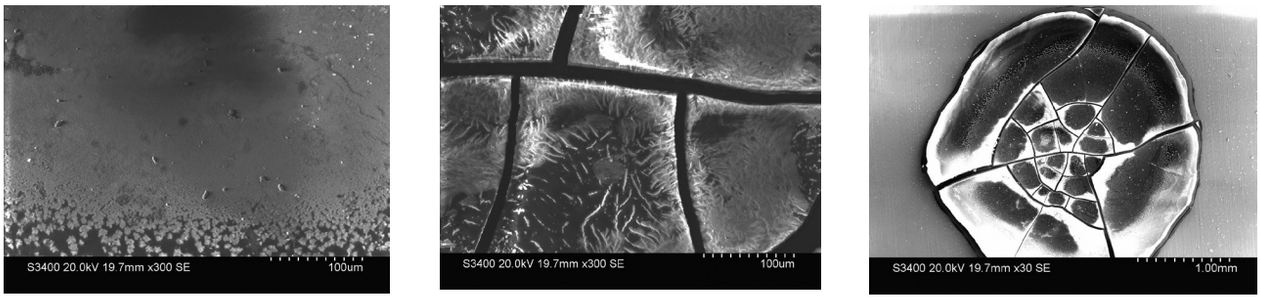
Исследование спектрального состава фаций сыворотки во вторичных электронах и распределение химических элементов в различных участках выполняли в растровом электронном микроскопе S-3400N с рентгеновской энергодисперсионной приставкой для элементного микроанализа INCA ADD009 фирмы Oxford.

Определение содержания элементов осуществляли при рабочем напряжении 10,0 кВ и токе электронного зонда 1.0–1,5 х 10 А. Время набора импульсов составляло 60–100 сек. При определении состава в качестве анализируемых линий были выбраны C K, O K, Na K, Mg K, Si K, P K, S K, Cl K, Ca K, K K. Представленные в работе данные о содержании анализируемых элементов приведены в весовых процентах.

Компьютерную обработку статистических данных проводили с использованием пакета программ Statistica 6.0. Различия между двумя независимыми группами определяли с использованием U критерия Манна-Уитни (Mann-Whitney U test) и двухвыборочного критерия Колмогорова-Смирнова (Kolmogorov-Smirnov two-sample test). Сравнение групп по качественному бинарному признаку проводили по точному двустороннему критерию Фишера (Fisher exact p) и критерию χ^2 (Chi – square). Для исследования связи двух признаков вычисляли критерий Спирмена (R). Статистически значимыми считали различия при $p<0,05$.

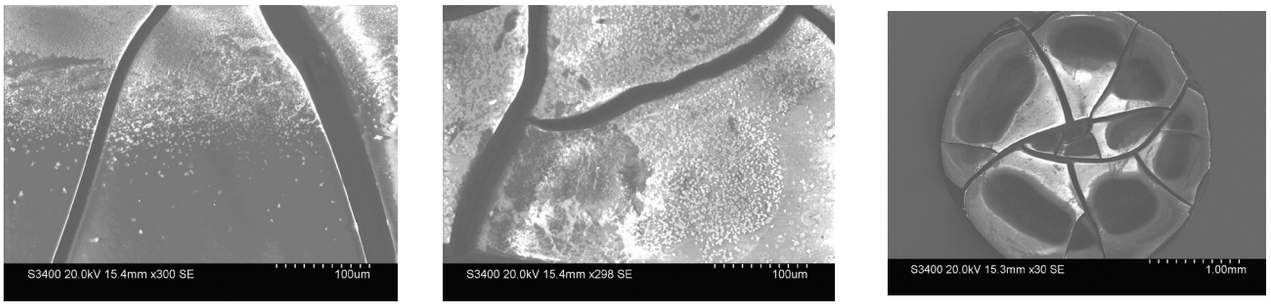
Результаты и обсуждение

На первом этапе изучали внешний вид фаций сыворотки крови всех лиц, вошедших в исследова-



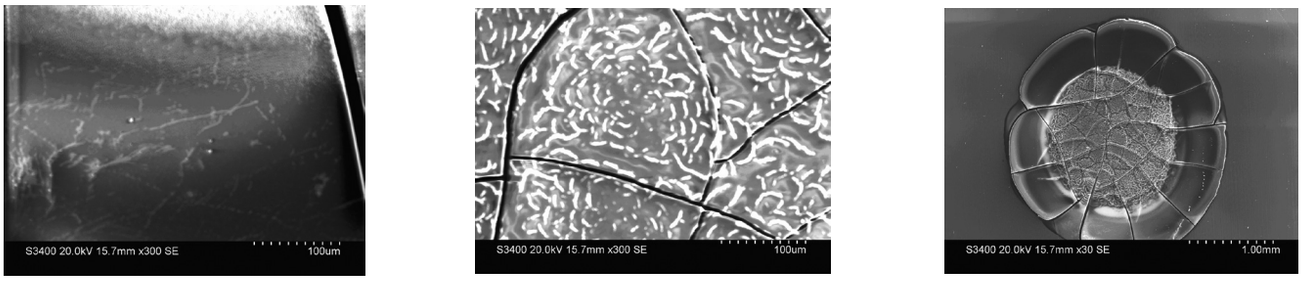
а) б) в)

Рис. 1. Общий вид фации сыворотки крови здорового человека (а), ее центральная (б) и периферическая (в) зоны.



а) б) в)

Рис. 2. Общий вид фации сыворотки крови больного со стенокардией напряжения III ФК (а), ее центральная (б) и периферическая (в) зоны.



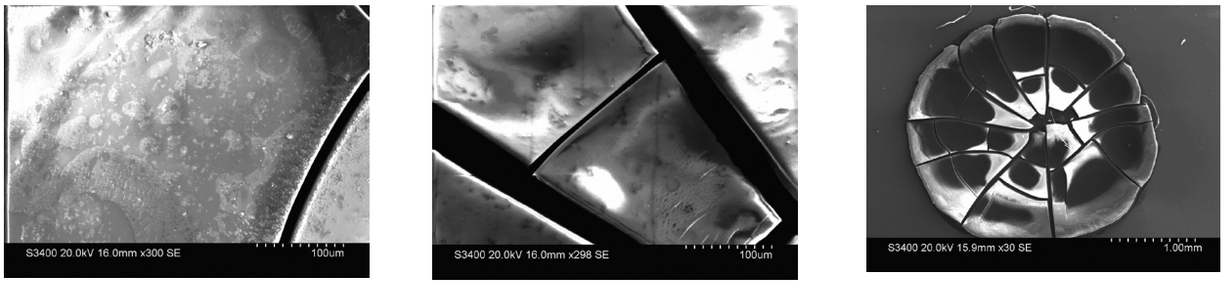
а) б) в)

Рис. 3. Общий вид фации сыворотки крови больного с заживающим инфарктом миокарда (а), ее центральная (б) и периферическая (в) зоны.

ние с отдельным рассмотрением периферической и центральной зоны каждой фации. В этой связи полученное нами изображение фации у человека без сердечно-сосудистых заболеваний (рис. 1 а) имеет четко выраженную концентрическую системную организацию с выделением краевой, промежуточной и центральной зон с формированием трещин и образованием структурных элементов. В центральной зоне (рис. 1 б) имеются дугообразные солевые отложения, расходящиеся как радиально, так и описывающие окружности вокруг центра; они так же принимают вид палочек, наплывов и капель. Периферическая зона (рис. 1 в) аркообразная, характеризуется практически полным отсутствием солевых отложений. Промежуточная зона прозрачная, не содержит кристаллов.

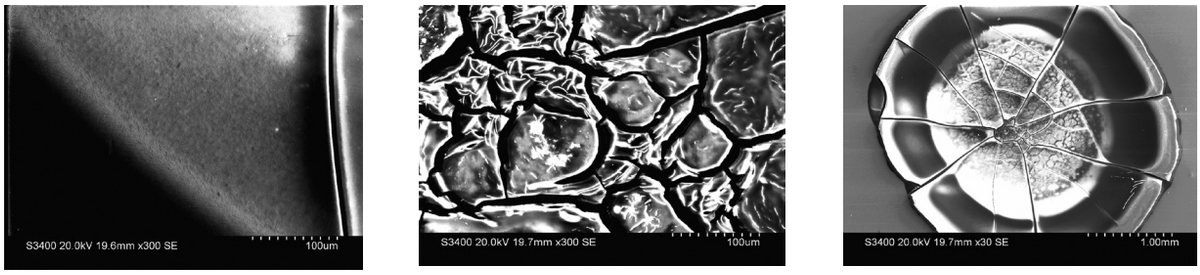
При стенокардии напряжения III функционального класса (рис. 2 а, б, в) общий вид фации характеризуется увеличением числа радиальных трещин, размеров периферической зоны, в центральной части отсутствует папоротникообразная структура, соли группируются в мелкие шаровидные наплывы, промежуточная зона выражена слабо, в периферической зоне накапливается повышенное количество солей в виде сферовидных кристаллов.

При инфаркте миокарда внешний вид фации сыворотки иной (рис. 3 а, б, в): значительно увеличивается центральная зона, общее количество радиальных трещин. Центральная зона характеризуется максимально плотным скоплением солевых кристаллов, напоминающих «бутоны роз», промежуточная зона нечеткая, в периферической зоне кристаллизация отсутствует.



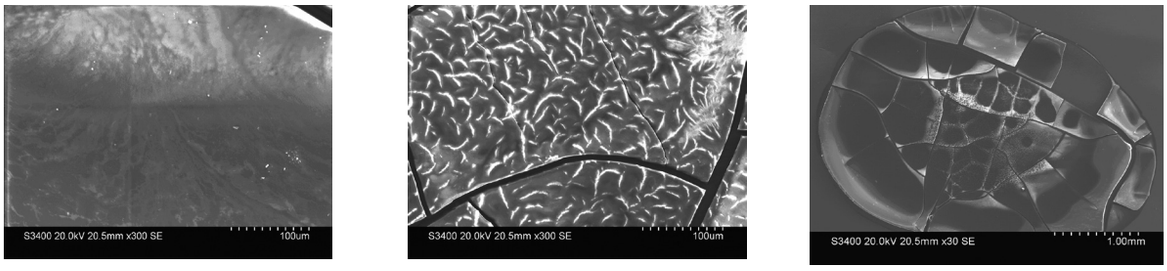
а) б) в)

Рис. 4. Общий вид фации сыворотки крови при гипертонической болезни.



а) б) в)

Рис. 5. Общий вид фации сыворотки крови больного с ПРФП (а), ее центральная (б) и периферическая (в) зоны.



а) б) в)

Рис. 6. Общий вид фации сыворотки крови больного с выраженной сердечной недостаточностью (а), ее центральная (б) и периферическая (в) зоны.

Общий вид фации сыворотки крови при гипертонической болезни (рис. 4 а, б, в) характеризуется отсутствием четкого зонального распределения, число радиальных трещин увеличено, отсутствуют аркообразные структуры. В центральной зоне не прослеживается кристаллизация, основная масса кристаллов в виде сфер локализуется в периферической зоне.

Общий вид фации сыворотки крови при ПРФП (рис. 5 а, б, в) характеризуется уменьшением количества радиальных и поперечных трещин, сужением периферической зоны с отсутствием в ней аркообразных структур и признаков кристаллообразования; в центральной зоне определяется несколько центров кристаллообразования, солевые включения расположены в виде скоплений палочек.

Вид фации сыворотки крови при выраженной сердечной недостаточности (рис. 6 а, б, в) характеризуется большим количеством поперечных при уменьшении числа радиальных трещин, отсутствием явных переходов между зонами; центральная часть сплошь заполнена кристаллами, преимущественно в виде радиально расположенных палочек; периферическая зона содержит единичные солевые включения.

На втором этапе исследования сопоставляли рентгеноструктурные особенности фаций с распределением химических элементов в их различных зонах при помощи рентгеноспектрального анализа. Установлено, что в фациях сыворотки крови здоровых людей центральная зона представлена преимущественно натрием (31,9±0,35 весовых%), хлором (32,8±0,34 весовых%) и кислородом (30,8±0,52 весовых%), фосфор в центральной зоне отсутствует. Периферическая зона характеризуется появлением фосфора (0,8±0,14 весовых%), снижением содер-

жания калия, увеличением количества кальция. Рост весового процента кальция, возможно, связан с регистрацией фосфора, поскольку кальций в составе кристаллов может быть только либо в виде ортофосфата, либо производных гидроксиапатита.

При рентгеноспектральном анализе фаций больных стенокардией напряжения выявлено, что в центральной зоне значительно увеличивается количество кислорода при снижении содержания натрия и хлора (40,8±0,58, 19,5±0,35, 26,7±0,37 весовых% соответственно), кальций отсутствует. В периферической зоне прослеживаются те же закономерности, однако появляется кальций (1,2±0,15 весовых%).

У больных инфарктом миокарда в центральной зоне фации по-прежнему преобладают натрий, хлор, кислород (23,9±0,39, 34,5±0,45, 34,3±0,65 весовых% соответственно), отмечается появление фосфора (0,7±0,14 весовых%); по мере удаления к периферии, снижается количество калия, хлора, возрастает весовой процент кислорода (49,2±0,7), кальций присутствует в обеих зонах.

Иной химический состав характерен для пациентов с гипертонической болезнью: в центральной зоне фации основным элементом является углерод (51,4±1,55 весовых%) на фоне снижения весовых процентов натрия, хлора и кислорода (10,2±0,36, 14,0±0,47, 17,9±0,74 соответственно), отсутствует кальций, в небольшом проценте встречается фосфор (0,4±0,07). Периферическая зона в основном состоит из кислорода (58,9±0,92 весовых%), возрастает содержание фосфора (4,7±0,35 весовых%), появляются кальций и магний, отсутствовавший во всех предыдущих группах (4,4±0,32, 1,9±0,38 весовых% соответственно).

При изучении фаций сыворотки пациентов с ПРФП установлено, что доминирующие позиции сохраняют кислород, хлор и натрий как в центре, так и на периферии фации, повсеместно отсутствует кальций, в центре в небольшом количестве содержится фосфор (0,6±0,12 весовых%).

При выраженной сердечной недостаточности интерес представляют особенности химического состава периферической зоны фации: здесь максимальна доля углерода (72,0±0,43 весовых%), практически отсутствует натрий (1,8±0,06 весовых%) и хлор (0,9±0,03 весовых%). Фосфор встречается только в центральной зоне, кальций – в обеих зонах.

При сопоставлении результатов рентгеноспектрального анализа с уровнем холестерина, глюкозы, гормонов щитовидной железы, присутствующих в сыворотке, а также параметрами ультразвукового обследования сердца статистически значимые корреляции не установлены.

Заключение. Проведенное исследование подтверждает обсуждаемую в литературе гипотезу о том, что атеросклероз и ассоциированные с ним клинические состояния входят в список заболеваний, в механизмах формирования которых кристаллизация играет значимую роль [2,3]. Объем наблюдений позволяет предполагать разнонаправленные изменения кристаллогенных свойств биосистем, включающие как гипо-, так и гипер-, и дизкристаллогенез, в случае формирования которого имеет место замещение одних биокристаллов на другие.

Выводы

1. Полученные данные выявляют характерные закономерности в формировании фаций сыворотки в зависимости от варианта кардиальной патологии.

2. Рентгеноспектральный анализ способствует объективизации оценки результатов.

3. В проведенном исследовании не установлены корреляции с уровнем холестерина, глюкозы, гормонов щитовидной железы, присутствующих в сыворотке, а также параметрами ультразвукового обследования сердца.

4. Разработка алгоритма диагностики различных заболеваний внутренних органов требует дальнейшего накопления банка данных для выявления характерных особенностей кристаллограмм, подтвержденных математическим моделированием.

Литература

1. Максимов С. А. Морфология твердой фазы биологических жидкостей как метод диагностики в медицине. Бюллетень сибирской медицины 2007; 4: 80–85.
2. Мартусевич А. К. Направленный кристаллогенез как одна из потенциальных перспектив терапии патологии желудочно-кишечного тракта. Гастроэнтерология Санкт-Петербурга 2008; 2–3: М71 – М72.
3. Мартусевич А. К., Воробьев А. В., Гришина А. А. Физиология и патология кристаллостаза: общая парадигма и перспективы изучения. Вестник Нижегородского университета имени Н. И. Лобачевского 2010; 1: 135–139.
4. Шабалин В. Н., Шатохина С. Н. Аутогенные ритмы и самоорганизация биологических жидкостей. Бюл. эксперим. биологии и медицины 1996; 10: С. 364–371.
5. Шабалин В. Н., Шатохина С. Н. Морфология биологических жидкостей в клинической лабораторной диагностике. Клинич. лаб. диагностика 2002; 3: 25–32.
6. Шатохина С. Н., Шабалин В. Н. Морфология биологических жидкостей организма человека. М., Наука; 2001; 361 с.
7. Яхно Т. А., Яхно В. Г. Основы структурной эволюции высыхающих капель биологических жидкостей. Журнал технической физики 2009; Том 79; Вып. 8: 133–141.
8. Khosravi-Darani K. Application of supercritical fluid extraction in biotechnology. Crit Rev Biotechnol 2005; 25 (4): 231–42.
9. Williams J. R. Supercritical fluids and their applications in biotechnology and related areas. Mol Biotechnol 2002: 22 (3): 263–86.

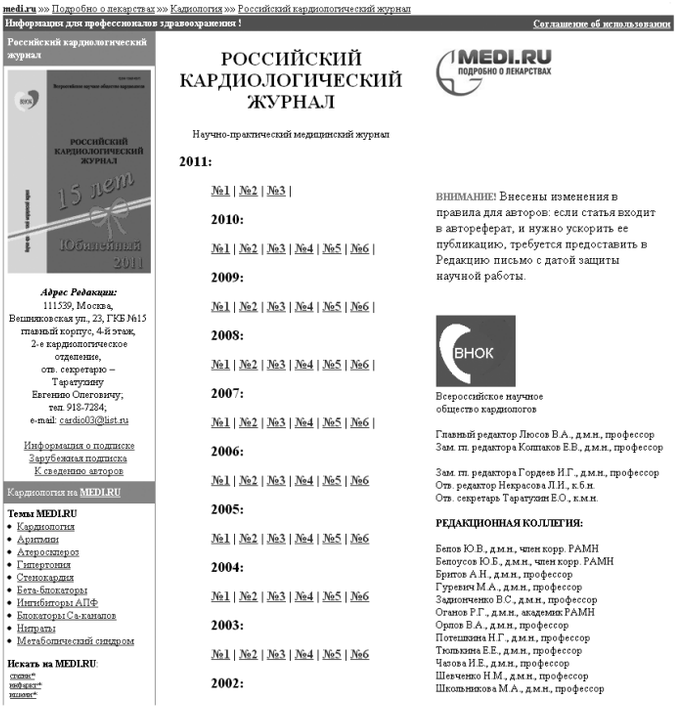
Abstract

In patients with various clinical forms of coronary heart disease (CHD), essential arterial hypertension (EAH), or chronic heart failure (CHFD), roentgen-structural and roentgen-spectral analysis of serum facies was performed. In total, 159 patients were examined (mean age 57,2±6,08 years). All participants were divided into six groups: Group I – with Functional Class (FC) III effort angina (n=19); Group II – with healing myocardial infarction, MI (n=10); Group III – with paroxysmal recurrent atrial fibrillation, PRAF (n=19); Group IV – with Stage II EAH (n=34); Group V – with FC III–IV ischemic CHF (n=17); and Group VI – relatively healthy people (n=30). Microphotography of the serum facies was performed using electronic microscopy (S-3400N); energy-dispersive spectral analysis of the facies was also performed. Increased peripheral zone with spherical crystals, together with globular formations and decalcination in the centre was linked to the diagnosis of stable angina. Peripheral zone decrystallization, increased central zone with rosette-like crystals, and weight percentage of phosphorus >0,5% was observed in MI patients. No obvious zone separation, increased number of radial fissures, migration of crystal mass from central to peripheral area, and weight percentages of carbon, magnesium, and calcium in the central area of >10%, <0,01%, and <0,4%, respectively, were registered in EAH. PRAF was characterised by several crystallization centres in the central zone, absence of calcium, and weight percentage of phosphorus of 0,6±0,12 in the centre. CHF patients demonstrated total crystallization of the centre, singular peripheral crystals, and maximal weight percentage of carbon in the peripheral zone (72,0±0,43%), with phosphorus and calcium identified, respectively, in the central zone only and both central and peripheral zones. Atherosclerosis and associated clinical conditions are among the diseases with an important pathogenetic role of crystallization.

Key words: Serum facies, roentgen-structural and roentgen-spectral analysis, cardiovascular disease.

Поступила 09/10 – 2011

© Коллектив авторов, 2011
Тел.: (342) 2266778
E-mail: karpuninapsma@mail.ru

[Карпунина Н. С. (*контактное лицо) – к. м.н., доцент кафедры госпитальной терапии № 1, Туев А. В.- заслуженный деятель науки РФ, д. м.н., профессор, заведующий кафедрой госпитальной терапии № 1, Волынцев А. Б. – д. м.н., профессор, заведующий кафедрой физики твердого тела, Аминова И. И. – студентка V курса физического факультета].

CARDIO.MEDI.RU – Интернет-сайт для врачей-кардиологов