



УДК 543.544.5.068.7:616-074:615.9

Применение комбинации «Высокоэффективная жидкостная хроматография – метод главных компонент» для распознавания синдрома эндогенной интоксикации. Часть I

Сычев С.Н., Гаврилина В.А.

Государственный университет учебно-научный производственный комплекс, Орел

Поступила в редакцию 6.06.2012 г.

Аннотация

Рассмотрено использование комбинации «высокоэффективная жидкостная хроматография – метод главных компонент» (ВЭЖХ – МГК) как метода распознавания последствий воздействия ксенобиотика при отсутствии ксенобиотика и его метаболитов в плазме крови (синдром эндогенной интоксикации). Показано, что используемая в работе методология может послужить основой для исследований в этой области медицины.

Ключевые слова: эндогенная интоксикация, высокоэффективная жидкостная хроматография, метод главных компонент

Examined using a combination of "high-performance liquid chromatography - principal component analysis" (HPLC - CIM) as a method for detecting effects of xenobiotics in the absence of a xenobiotic and its metabolites in the blood plasma (endogenous intoxication syndrome). It is shown that the methodology used in the paper can serve as a basis for research in this field. Endogenous intoxication, high performance liquid chromatography, the method of principal components. Examined using a combination of "high-performance liquid chromatography - a method of principal components" (HPLC - PCA) as a method for detecting effects of xenobiotics in the absence of xenobiotics and its metabolites in blood plasma (a syndrome of endogenous intoxication). It is shown that the methodology used in the work may serve as a basis for a major breakthrough in this field of medicine.

Keywords: endogenous intoxication, high-performance liquid chromatography, method of principal components

Введение

В настоящее время при диагностике заболеваний или определении любых неблагоприятных воздействий на организм человека и животных важная роль отводится исследованию синдрома эндогенной интоксикации (ЭИ). Перечень веществ, относящихся к субстратам ЭИ, постоянно растет, но основной упор делается на так называемые «молекулы средней массы» (МСМ): среднемолекулярные продукты протеолиза [1], структура которых чрезвычайно разнообразна. Сперва к МСМ относили лишь субстанции с мол. массой 1500–2000 Д, включающие простые и сложные пептиды, гликопептиды,

нуклеопептиды. Затем к МСМ стали относить и пептиды с мол. массой до 5000 Д, а также некоторые гуморальные регуляторы: инсулин, глюкагон, различные «тропины» и их комплексы, некоторые витамины, нуклеотиды и др. В последние годы ответственными за токсический эффект считают также вещества углеводной природы – олигосахариды, производные глюконовых кислот, некоторых спиртов и т.д. В работах последних лет было определено, что среднемолекулярные пептиды характеризуются высоким содержанием дикарбоновых аминокислот, лизина, глицина и т.д.

Очевидно, что на фоне информации о все возрастающем количестве МСМ начинает преобладать мнение о том, что специфичность действия МСМ в зависимости от характера патологического процесса отсутствует.

В обзоре [1] показано, что определение МСМ является интегральным показателем, характеризующим метаболические нарушения независимо от этиологических причин и высказывается убеждение, что дальнейшее изучение особенностей состава МСМ позволит оптимизировать диагностику выраженности нарушений метаболического гомеостаза при различных патологических состояниях. В свете вышеизложенного (непрерывное увеличение соединений, входящих в состав МСМ) последнее пожелание выглядит как насмешка, особенно при оценке уровня экспериментальных работ в этой области (см., например, работу [2]). Кроме того, используемые большинством медиков методики определения МСМ имеют интегральный характер (определение оптической плотности при известных длинах волн) и принципиально не могут (и не должны по задумке авторов) быть специфичными, а идентификация в ряде случаев ряда компонентов МСМ недостаточна для построения хотя бы ориентировочной модели эндогенной интоксикации в конкретном случае.

Тем не менее из анализа работ, выполненных в период с 1970 по 2011 гг., можно сделать следующие выводы:

1. Синдром эндогенной интоксикации существует, его существование многократно доказано и не противоречит здравому смыслу.

2. Заметные даже при использовании интегральных кривых поглощения в УФ-диапазоне изменения оптической плотности биологических жидкостей (например, плазмы крови) свидетельствуют о мощном процессе, затрагивающем не менее 10-15 % соединений, содержащихся в биожидкости (по массе).

3. Вывод о неспецифичности ответа биосистемы на внешнее воздействие и эндогенную интоксикацию не представляется обоснованным ввиду отсутствия методов определения этой самой специфичности или неспецифичности.

4. Отсутствие какой-либо систематизации при обработке экспериментальных данных по эндогенной интоксикации или каких-либо вменяемых моделей этого явления делает бессмысленным дальнейшее проведение работ в этой области без разрешения указанной проблемы.

Задача использования отклика биосистем (в том числе проявление эндогенной интоксикации) для распознавания способа воздействия на биосистему близка к общей проблеме определения идентичности, подобия и не идентичности систем, состоящих из большого, неизвестного и способного изменяться во времени количества компонентов и описываемых многофакторной моделью с неизвестным или произвольно установленным количеством параметров. Такие задачи могут быть решены с помощью комбинированного метода «ВЭЖХ-МГК» [3] с многоволновым детектированием при выполнении следующих условий:

- изменения в химической системе плазмы крови могут быть как неспецифичными, так и специфичными для каждого ксенобиотика, введенного в организм;

- изменения происходят таким образом, что электронные спектры средних и малых по размерам соединений, содержащихся или появившихся в плазме в процессе воздействия ксенобиотика (в том числе метаболиты), могут быть линейными комбинациями всего лишь нескольких (4-5) базовых электронных спектров;

- набор базовых линейно независимых электронных спектров должен описывать все возможные состояния плазмы, как в явном (например, в виде хроматографических пиков), так и в неявном (например, изменение спектральных отношений фонового поглощения в процессе фотометрирования хроматограммы) виде, в том числе специфичные для воздействия данного вида ксенобиотика.

Предварительные результаты разработки экспресс-метода распознавания отравления организма крысы этанолом.

В представленном разделе рассмотрены результаты предварительных исследований по использованию реакции биосистемы (плазмы крови) на введение ксенобиотика для распознавания ксенобиотика. В качестве объекта исследований выбрана плазма крови; основным методом исследования последствий введения ксенобиотика выбран комбинированный метод «ВЭЖХ-МГК».

Последовательность проведения процедуры получения и обработки экспериментальных данных методом «ВЭЖХ-МГК» с многоволновым детектированием выглядит следующим образом:

1. Забор крови у здоровых крыс с получением плазмы крови.
2. Введение ксенобиотика и забор крови у отравленных крыс с получением плазмы крови.
2. Получение многоволновых хроматограмм плазмы крови в графическом виде
3. Получение многоволновых хроматограмм плазмы крови в виде числовой матрицы A кодов оптических плотностей.
4. Транспонирование исходной числовой матрицы кодов оптических плотностей A и ограничение количества столбцов матрицы A от 400 до 800 столбцов в зависимости от условий анализа.
5. Получение матрицы линейно независимых факторов как «паспорта» биосистемы плазмы путем сокращения ранга корреляционной матрицы $A \cdot A^T$, расчет вкладов факторов.
6. Корреляционный анализ и сопоставление полученных факторов и векторов для разных образцов плазмы крови крыс.

Приведенная последовательность действий может быть охарактеризована как распознавание воздействия ксенобиотика на плазму крови, так как в процессе получения хроматограмм не был идентифицирован ни один хроматографический пик.

Подробно рассмотрим процедуру получения экспериментальных данных и их обработку.

Забор крови у здоровых крыс с получением плазмы крови. Работа выполнена на 6-ти белых беспородных крысах-самцах массой 200-250 г, содержащихся в стандартных условиях вивария. Перед забором крови крысы метились, подвергаясь при этом стрессу. Забор крови осуществлялся стандартным способом из подъязычной вены в пробирки с ЭДТА. Затем кровь центрифугировалась 10 мин при 3000 об/мин. Полученная плазма отбиралась для исследований.

Введение ксенобиотика и забор крови у отравленных крыс с получением плазмы крови. Работа выполнена на тех же крысах, у которых предварительно для анализа была отобрана кровь. Введение ксенобиотиков осуществлялась через неделю после предварительного забора крови. Крысы были разделены на 2 опытные группы, которым вводился ксенобиотик, и контрольную группу. В качестве ксенобиотиков был выбран этанол.

Этанол был введен перорально. Забор крови осуществлялся тем же способом после наступления состояния опьянения и отравления через 30 минут после введения ксенобиотика в пробирки с ЭДТА. Только в одном случае в группе № 1, которая подвергалась интоксикации этанолом, кровь забиралась декапитированием. Отобранная кровь центрифугировалась 10 мин при 3000 об/мин. Полученная плазма отбиралась для исследований. Плазма полученная от крыс группы № 2 была гемолизирована, возможно, вследствие стресса крыс во время забора крови.

Получение хроматограмм образцов плазмы крыс в графическом и цифровом виде. В качестве основного метода предварительных испытаний выбран метод обращенно-фазовой высокоэффективной хроматографии (ОФ ВЭЖХ) с многоволновым спектрофотометрическим детектированием в диапазоне 210-320 нм. Для получения хроматограмм образцов плазмы крови использовался хроматограф «Милихром-5-М» с двухнасосной жидкостной системой, позволяющей работать в режиме 8-ми ступенчатого градиента модификатора. Хроматографические условия: Элюент – ступенчатый градиент ацетонитрила в буфере «А» (табл. 1):

Таблица 1. Форма градиента

№ ступени	«А»:ацетонитрил, части об.	Объем ступени, мм ³
1	100	500
2	95:5	500
3	90:10	500
4	80:20	500
5	60:40	600
6	40:60	600
7	80:20	600
8	100	600

Регенерация элюентом первой ступени. Объем регенерации 500 мм³. Объем пробы 5 мм³. Колонка 80x4 заполнена Сепароном С18 (5 мкм), расход 120 мм³/мин., температура термостата хроматографической колонки 35°C.

Проба анализируется два раза в двух диапазонах детекции:

- 1) 210 нм, 220 нм, 230 нм, 240 нм, 254 нм;
- 2) 260 нм, 270 нм, 280 нм, 290 нм, 300 нм.

Буфер «А» представляет собой 0,1% - ный раствор трифторуксусной кислоты с рН в области 2,3 – 2,6. После 2-3 анализов проводится полный цикл регенерации колонки ацетонитрилом. Типичные хроматограммы плазмы крови крыс приведены на рис. 1 и 2.

Приборные графические файлы переводятся в текстовые, транспонируются и приводятся к виду 5x400 или 5x800, где 5 – количество строк, а 400 или 800 – количество столбцов исходной матрицы А кодов оптических плотностей многоволновой хроматограммы плазмы крови (табл.2).

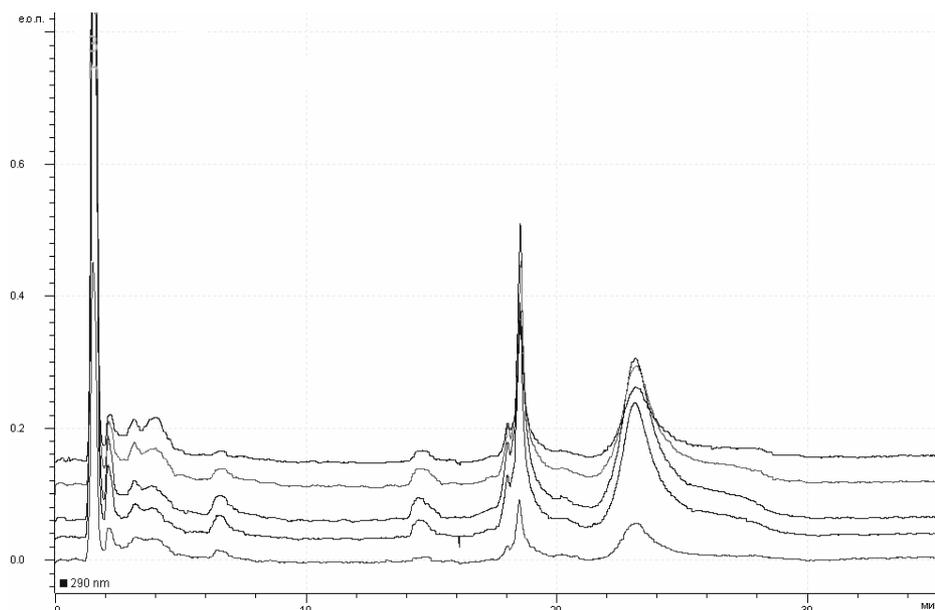


Рис. 1. Хроматограмма плазмы крови крысы.
Длины волн 210, 220, 230, 240, 254 нм

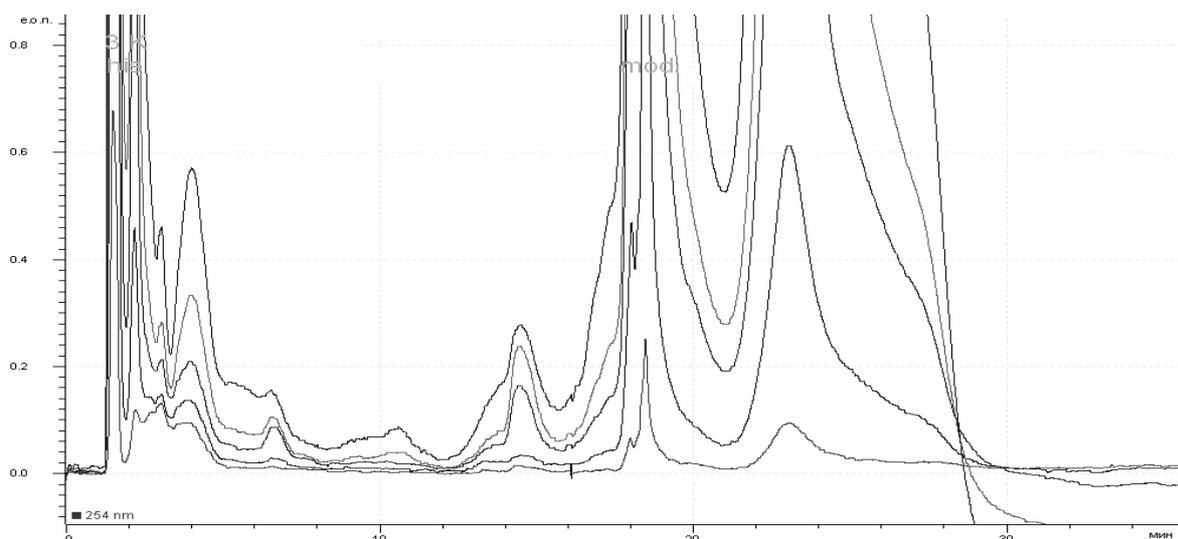


Рис. 2. Хроматограмма той же (рис. 1) плазмы крови крысы в уменьшенном масштабе. Длины волн 210, 220, 230, 240, 254 нм

Таблица 2. Фрагмент матрицы кодов оптических плотностей, соответствующий временам удерживания от 1,2 до 1,8 мин. на рис.2

длина волны	Коды оптических плотностей через 0,06 мин. от 1.2 до 1.8 мин.										
	1.2	1.26	1.32	1.38	1.44	1.50	1.56	1.62	1.66	1.74	1.80
260	65	18117	5281	1219	528	891	2069	2909	3041	2671	2172
270	8	10964	3520	695	239	316	685	1018	1163	1161	1038
280	149	7708	1410	308	119	156	283	365	441	483	538
290	83	2421	411	89	33	53	108	140	185	253	340
300	20	321	50	23	16	16	52	59	116	198	310

Сущность применения метода главных компонент для описания и сравнения многокомпонентных физико-химических систем

Основная идея использования метода главных компонент при распознавании воздействия ксенобиотиков на плазму крови заключается в получении набора линейно – независимых факторов из матриц кодов оптических плотностей многоволновых хроматограмм, присущих воздействию конкретного ксенобиотика. Каждой группе ксенобиотиков (а лучше каждому ксенобиотику) должен соответствовать свой набор значений линейно независимых факторов. Получение таких факторов, их интерпретация и использование для распознавания воздействия ксенобиотиков и составляет возможную область использования метода главных компонент в токсикологии.

Устойчивость линейно независимых факторов плазмы крови

Биологические объекты известны своей неустойчивостью и легко изменяются при минимальных воздействиях. При таких обстоятельствах для распознавания отклонений было крайне важно исследовать устойчивость факторов, полученных методом «ВЭЖХ – МГК» из многоволновых хроматограмм плазмы для одних и тех же крыс, находящихся в максимально спокойном состоянии на протяжении некоторого времени. Экспериментальные результаты такого эксперимента и обработка методом «ВЭЖХ – МГК» представлена ниже. Крыса № 3, плазма нормальная, кровь отобрана спокойно (табл. 3, 4)

Таблица 3. Значения факторов и их вклады, длины волн 210, 220, 230, 240, 250 нм

Длины волн, нм	Факторы			
	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4
210	1.580	0.639	-0.485	0.245
220	0.332	-0.710	1.485	-0.616
230	-0.309	-1.395	-0.876	0.626
240	-0.725	0.546	-0.688	-1.379
254	-0.879	0.919	0.564	1.125
Вклады факторов в %				
	84.72	10.53	3.55	1.19

Таблица 4. Значения факторов и их вклады, длины волн 260, 270, 280, 290, 300 нм

Длины волн, нм	Факторы			
	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4
260	0.690	-1.386	-0.781	0.439
270	-0.202	-0.592	1.307	-1.050
280	-1.216	0.201	0.304	1.261
290	-0.569	0.656	-1.204	-0.998
300	1.297	1.121	0.375	0.347
Вклады факторов в %				
	61.51	32.89	4.13	1.15

Для проверки гипотезы об устойчивости факторов плазмы, через семь дней у той же крысы № 3 была отобрана кровь из подязычной вены. Кровь была отобрана спокойно, плазма хорошая. Результаты приведены в таблицах 5 и 6.

Для определения устойчивости факторов получим коэффициенты попарной корреляции соответствующих факторов, полученных из экспериментальных данных с разницей в семь суток. Результаты представлены в таблицах 7 и 8.

Таблица 5. Значения факторов и их вклады, длины волн 210, 220, 230, 240, 250 нм, через семь дней

Длины волн, нм	Факторы			
	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4
210	1.580	0.639	-0.485	0.245
220	0.332	-0.710	1.485	-0.616
230	-0.309	-1.395	-0.876	0.626
240	-0.725	0.546	-0.688	-1.379
254	-0.879	0.919	0.564	1.125
Вклады факторов в %				
	84.72	10.53	3.55	1.19

Таблица 6. Значения факторов и их вклады, длины волн 260, 270, 280, 290, 300 нм, через семь дней

Длины волн, нм	Факторы			
	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4
260	0.337	-1.464	-0.393	0.887
270	-0.195	-0.571	1.084	-1.289
280	-1.393	0.378	-1.036	-0.207
290	-0.124	0.913	1.050	1.118
300	1.375	0.744	-0.705	-0.509
Вклады факторов в %				
	65.79	20.54	8.65	5.0160

Таблица 7. Матрица корреляции факторов двух проб плазмы крови крысы № 3 с разницей в 7 суток в диапазоне 260 – 300 нм

	F1	F2	F3	F4	F1 ₇	F2 ₇	F3 ₇	F4 ₇
F1	1.000	0.000	0.000	-0.000	0.955	0.207	-0.069	-0.201
F2	0.000	1.000	-0.000	0.000	-0.227	0.969	-0.077	-0.055
F3	0.000	-0.000	1.000	0.000	-0.185	-0.102	-0.030	-0.977
F4	-0.000	0.000	0.000	1.000	-0.043	-0.086	-0.994	0.047
F1 ₇	0.955	-0.227	-0.185	-0.043	1.000	0.000	-0.000	-0.000
F2 ₇	0.207	0.969	-0.102	-0.086	0.000	1.000	0.000	0.000
F3 ₇	-0.069	-0.078	-0.030	-0.994	-0.000	0.000	1.000	-0.000
F4 ₇	-0.201	-0.055	-0.977	0.047	-0.000	0.000	-0.000	1.000

Таблица 8. Матрица корреляции факторов двух проб плазмы крови крысы № 3 с разницей в 7 суток в диапазоне 210 – 254 нм

	F1	F2	F3	F4	F1 ₇	F2 ₇	F3 ₇	F4 ₇
F1	1.000	-0.000	0.000	-0.000	0.973	-0.211	0.046	-0.086
F2	-0.000	1.000	-0.000	-0.000	0.229	0.918	-0.052	0.319
F3	0.000	-0.000	1.000	0.000	-0.001	0.100	0.976	-0.108
F4	-0.000	-0.000	0.000	1.000	0.012	-0.320	0.206	0.938
F1 ₇	0.973	0.229	-0.001	0.012	1.000	0.000	0.035	0.000
F2 ₇	-0.211	0.918	0.100	-0.320	0.000	1.000	-0.026	0.000
F3 ₇	0.046	-0.052	0.976	0.206	0.035	-0.026	1.000	0.067
F4 ₇	-0.086	0.319	-0.109	0.938	0.000	0.000	0.067	1.000

Заключение

Несмотря на подвижность таких систем, как плазма крови, в спокойных одинаковых условиях для одной и той же крысы коэффициенты корреляции факторов с вероятностью 95% находятся в диапазоне от 0,94 до 1,00, что очень хорошо для биологических систем и, вдобавок, количественно характеризует крыс как беспрецедентно устойчивых к внешним воздействиям высокоорганизованных животных. Устойчивость факторов делает возможным их применение как реперов при распознавании состояния крысы.

Список литературы

1.Карякина Е.В., Белова С.В. Молекулы средней массы как интегральный показатель метаболических нарушений // Клиническая лабораторная диагностика. 2004. № 3. С. 3-8.

2.Гаврилов В.Б., Лобко Н.Ф. Определение тирозин- и триптофансодержащих пептидов в плазме крови по поглощению в УФ-спектре // Клиническая лабораторная диагностика. 2004. № 3. С. 12-16.

3.Сычев С.Н., Гаврилина В.А. Метод контроля качества вина с помощью комбинации «ВЭЖХ - МГК» // LAMBERT Academic Publishing. 2012. 112 с.

Сычев Сергей Николаевич – д.т.н., профессор кафедры «Химия», заведующий лабораторией «Высокоэффективная жидкостная хроматография», Государственный университет УНПК, Орел

Гаврилина Вера Александровна – к.т.н., доцент кафедры «Химия», инженер лаборатории «Высокоэффективная жидкостная хроматография», Государственный университет УНПК, Орел

Sychev Sergey N. – Doctor of Technical Sciences, Professor, Department of Chemistry, Head of Laboratory "HPLC", UNPK State University, Orel

Gavrilina Vera A. – Ph.D., Associate Professor of Department Chemistry", Engineer Lab "HPLC", UNPK State University, Orel, e-mail: chemistry@ostu.ru