Использование стабильных изотопов в развивающихся странах: Безопасные метки для изучения режима питания

„ Немые метки " могут помочь работникам здравоохранения в поиске ответов на ряд важных вопросов

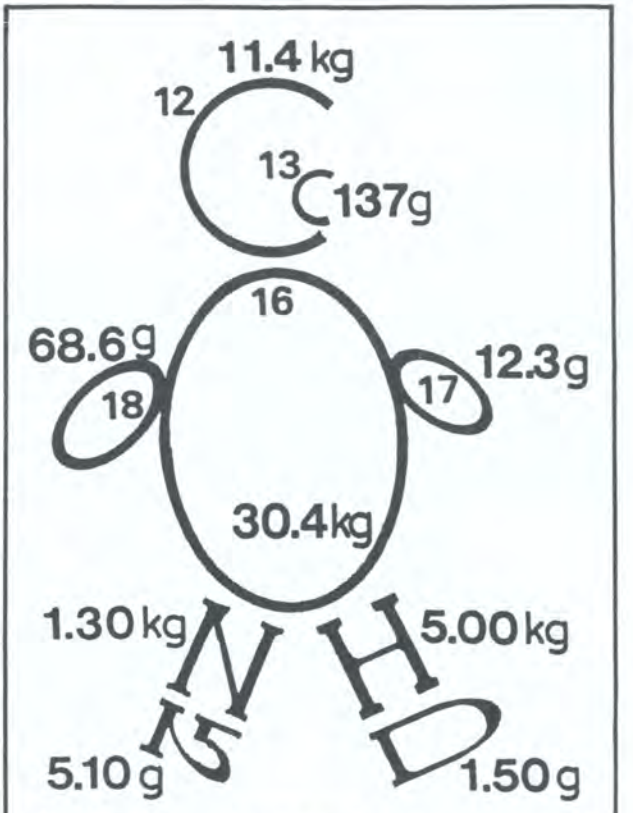
Питер Д. Кляйн и Е. Розланд Кляйн

Сколько калорий потребляет грудной ребенок с материнским молоком? Каково недельное потребление материнского молока? Какое влияние оказывает окружающая среда на энергетические потребности детей? Насколько адекватно поддерживает содержащийся в диете белок синтез составляющих элементов в организме? Какие пищевые продукты лучше всего рекомендовать для питания ребенка, выздоравливающего от желудочных заболеваний, например, диарреи?

Количественные ответы на подобные вопросы могут быть получены при использовании стабильных нерадиоактивных изотопных меток. Ответы эти имеют важное значение при оценке диеты грудных младенцев, детей, беременных и кормящих женщин, а также тех, кто ограничен в продуктах питания. Ввиду того, что стабильные меченые изотопы полностью безвредны, они могут свободно использоваться при исследованиях на всех группах населения в области здравоохранения, питания и сельского хозяйства.

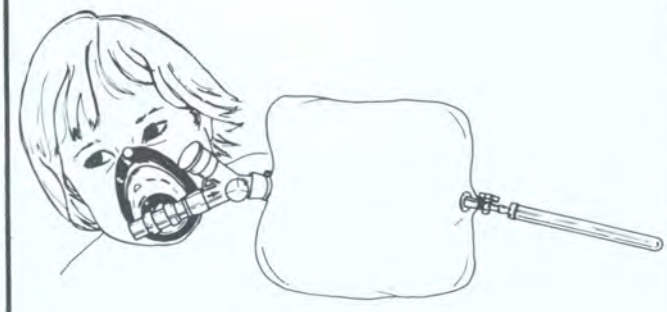
Какие стабильные изотопы используются?

При изучении биологических процессов основное внимание сосредоточено на поведении ограниченного числа элементов: водорода (H), углерода (C), азота (N), и кислорода (O). Каждый из этих элементов существует в природе в двух или более стабильных формах, отличающихся только количеством нейтронов в ядре. В каждом случае основному легкому изотопу (водороду-1, углероду-12, азоту-14 или кислороду-16) сопутствуют в постоянной пропорции один или более изотопов с более высоким атомным весом, и содержание которого колеблется в пределах от 0,02 % до 1,11 %. Количественный анализ составляющих элементов в организме человека показывает, что при весе 50 кг их содержание составляет суммар-



В человеческом организме содержатся значительные количества стабильных изотопов, как изображено на этой диаграмме. При весе 50 кг на более тяжелые изотопы (водород-2, углерод-13, азот-15, кислород 17 и кислород-18) приходится 225 г.: (д-р Вада, Мицубиси-Касаи)

Д-р Питер Д. Кляйн – Директор лаборатории стабильных изотопов, Е. Розланд Кляйн – Научный редактор Байлорского медицинского колледжа и Техасской детской больницы и отделения педиатрии при службе сельскохозяйственных исследований Министерства сельского хозяйства США, Хаустон, Техас 77030, США.



Пробы выдыхаемой двуокиси углерода для измерения изотопных соотношений легко берутся даже у детей. Пробы хранятся в гибких контейнерах, пока они не потребуются для анализа

но 225 г водорода-2, углерода-13, азота-15, кислорода-17 и кислорода-18 *(см. диаграмму)*.

Хотя и наблюдаются различия в соотношениях водорода-2 и водорода-1, углерода-13 и углерода-12, азота-15 и азота-14, кислорода-18 и кислорода-16, для каждого элемента характерен определенный предел содержания, и на этом основано использование изотопных меток. Для целей этого метода каждый элемент может быть обогащен до 99 % или выше по содержанию более тяжелого изотопа. В этих процедурах используются небольшие различия в скорости обмена (например, дейтерий) или криогенная перегонка окиси углерода или окиси азота для удаления легкого изотопа и соответственно для концентрации тяжелого. Обогащенная форма (например $^{2}H_2O$ или $H_2{}^{18}O$) может использоваться непосредственно, $^{13}CO_2$ можно ввести в растения биосинтетическими методами, или изотоп может быть трансформирован путем органического синтеза в меченые жиры, углеводы или аминокислоты.

Как стабильные изотопы используются при исследованиях питания?

Вскоре после открытия дейтерия в 1932 г. Шонхаймер и Риттенберг провели первый опыт исследования питания с использованием стабильной изотопной метки. Они ввели частично обогащенное дейтерием льняное масло двум мышам и ожидали, что дейтерий будет быстро выведен в результате окисления жира под действием двуокиси углерода и воды. Высвободилось же (через мочу) менее половины ожидаемого количества меченого изотопа, а остальная часть вошла в жировые запасы организма мышей. Таким образом был впервые продемонстрирован динамический характер элементов, составляющих живой организм.

В настоящее время привлекательная черта применения стабильных изотопных меток, помимо их безопасности, заключается в том, что их можно вводить перорально, а образцы продуктов обмена, в которые они введены, (например, вода, двуокись углерода, мочевина) могут быть взяты из выдыхаемого воздуха, слюны, молока, мочи и стула. Использование подобных процедур, не связанных с вмешательством в функционирование организма, упрощает исследования в полевых условиях, облегчает подбор и способствует активному содействию со стороны участников опытов.

Как проводятся измерения изотопных меток?

Стабильные изотопы часто называют „немыми метками", так как они не являются источником поддающихся внешнему измерению излучений и их содержание сверх естественных уровней можно обнаружить только в результате изменений в соотношении второстепенных и основных изотопов. В течение многих лет для измерения таких соотношений используются изотопные масс-спектрометры, в которых тяжелые и легкие формы одних и тех же молекул подвергаются разделению для количественного определения.

Твердые материалы могут быть подвергнуты полному сжиганию, а остающиеся в результате двуокись углерода и вода очищаются для изотопного анализа на вакуумной линии (Фото Джека Дайкинга, USDA/ARS)

В таких приборах очищенная проба газа – водорода, двуокиси углерода или азота вводится через строго ограниченное отверстие в ионный источник в условиях вакуума. Молекулы газа бомбардируются потоком электронов; в результате они получают положительный заряд и ускоряются в магнитном поле. Здесь молекулы ионизированного газа распределяются по массе и ударяют в отдельные мишени. При этом ионы генерируют ток, пропорциональный их порядковым номерам, что позволяет произвести их количественное определение.

Масс-спектрометрия при определении изотопных соотношений дает очень точные значения содержания изотопов, однако ее применение требует значительных капитальных вложений и наличия крупных установок для подготовки, очистки и анализа образцов. В связи с этим исследуются альтернативные оптико-спектроскопические методы, позволяющие производить более простые, легкие и менее дорогостоящие анализы. Уже применялась эмиссионная спектрометрия для тысяч анализов образцов азота-15, полученных в ходе сельскохозяйственных исследований, а также для исследовательских работ по проблемам питания, в которых используется азот-15. Для определения концентрации дейтерия в содержащихся в организме жидкостях используется метод измерения поглощения инфракрасного излучения. Недавно был описан новый принцип инфракрасного гетеродина, который позволяет получить значения изотопного отношения (углерод-13/углерод-12) в выдыхаемом углекислом газе. Таким образом, развивается процесс взятия на вооружение недорогих приборов для вычисления содержания стабильных изотопов, что должно расширить и ускорить применение этих методов в развивающихся странах.

Анализ составляющих человеческого организма с помощью изотопов воды дает возможность количественно оценить распределение пищевых энергетических ресурсов на обезжиренную массу тела и запасы жира (Фото Джека Дайкинга, USDA/ARS)

Общие протоколы

Работники здравоохранения в каждой стране уделяют постоянное внимание режимам питания отдельных групп населения или возрастных групп. В этом контексте универсальное применение должна получить серия общих измерений содержания стабильных изотопов, для которой требуется в очень небольшой степени или не требуется вообще адаптация к местным условиям. Приглашенные в МАГАТЭ консультанты согласились, что в эти протоколы должны включаться результаты следующих исследований с использованием изотопных меток:

- Оценка общего расхода энергии на одного индивида.
- Определение обезжиренной массы тела и соответственно процента жира.
- Простой метод измерения общего потока азота.
- Количественное выражение процесса улучшения поглощения и усвоения питательных веществ после диарреи.

ОЦЕНКА ОБЩЕГО РАСХОДА ЭНЕРГИИ. Расход калорий у человека различен в течение дня: низший уровень наблюдается в течение сна, а пик достигается во время затраты мускульных усилий в ходе работы или физических упражнений. Обычные оценки расхода энергии базируются на скорости поглощения кислорода и выдыхания углекислого газа. Как правило, измерения проводятся в состоянии покоя. Измерения расхода энергии путем анализа выдыхаемого газа в процессе всего спектра активности индивида трудны, ограничены по характеру и громоздки. Более того, много проблем возникает при долгосрочной интеграции видов деятельности с различной степенью активности.

Недавно введенный в действие метод (основанный на использовании $^{2}H_2O$ и $H_2{}^{18}O$) обещает преодолеть эти трудности. Когда в организм испытуемого вводится вода, содержащая известный процент дейтерия (вода двойной метки), оба изотопа смешиваются с водой в организме и выводятся в течение нескольких дней. Оценка оборота воды в организме может быть сделана путем ежедневных измерений концентрации водорода-2 в пробах мочи или слюны. Когда эти пробы анализируются на содержание кислорода-18, полученное значение отразит более высокую скорость его выведения по сравнению с дейтерием, поскольку

кислород-18 содержится также в выдыхаемом углекислом газе. Разница в скоростях выведения между кислородом-18 и углеродом-2 дает возможность получить объем двуокиси углерода, выработанный за время наблюдения. Этот показатель может быть использован для расчета общего расхода энергии индивида.

В зависимости от климатических условий и уровней активности обмена веществ метод с использованием двойной метки воды дает количественное определение расхода энергии за период от 5 до 18 дней. Такие измерения дадут, например, возможность выяснить, существует ли значительная разница между группами населения в энергетических потребностях для выполнения схожих физических работ.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЕЗЖИРЕННОЙ МАССЫ ТЕЛА. Для оценки содержания жира в организме в соотношении с остальной массой тела часто применяются антропометрические измерения роста, веса и толщины кожного покрова. Эти оценки основываются на определенных значениях этих показателей для данной группы населения, и подтверждаются для отдельного человека прямыми измерениями содержания воды в организме методом изотопного разбавления. В организм вводится определенная доза воды, меченной водородом-2 или кислородом-18, после чего дается от 4 до 6 часов на ее равномерное распространение в организме. Концентрация указанных изотопов в слюне или моче позволит определить степень их разбавления. У нормального здорового человека ткани, содержащие воду, на 73 % состоят из обезжиренной массы тела, но этот процент может быть выше при недостаточном питании. Когда вычислена обезжиренная масса тела, то разница в весовых данных представляет собой количество жировых тканей. Оценка изменений в составляющих организм тканях играет важную роль после голодания, во время набора веса и возмужания, а также в течение беременности и кормления грудью.

ПРОСТОЙ МЕТОД ИЗМЕРЕНИЯ ОБЩЕГО ПОТОКА АЗОТА. Содержащийся в пищевом белке азот входит составной частью в различные аминокислоты, которые участвуют в синтезе всех белковых соединений в организме и продуктами распада которых являются мочевина и аммиак. Во время стрессов процессы распада белковых соединений преобладают над синтезом и создается отрицательный баланс между поступлением белка с пищей и его потерями в результате распада. Хотя в результате тщательных анализов и ведения записей ежедневного потребления азота с пищей и его выведения из организма можно выявить долгосрочные тенденции в балансе азота, необходимо иметь возможность проводить оперативные измерения, отражающие оборот белка в организме. Такие измерения обеспечиваются простым методом введения перорально единичной дозы аминокислоты или предпочтительно белка, меченного азотом-15. Примером могут служить дрожжи, выращенные в среде, содержащей $(^{15}NH_4)_2SO_4$. В течение 9–12 часов собирается моча и определяется содержание меченого азота в NH_3 и в мочевине. Арифметическое или гармоническое среднее между этими двумя величинами обеспечивает надежную оценку оборота белка в организме, которая не зависит от изменений в метаболизме азота вне белковых соединений. Поскольку этот метод легок для применения, сбор образцов прост и требования к анализу не сложны, он идеален для выяснения адекватности поступления пищевого белка при усиленном питании после различных форм недоедания.

ПОГЛОЩЕНИЕ И УСВОЕНИЕ ПИТАТЕЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ ПОСЛЕ ДИАРРЕИ. Грудные младенцы в развивающихся странах часто страдают от диарреи после отнятия от груди. Это вызывает обезвоживание организма и препятствует поступлению питательных веществ в результате инфекционного поражения слизистой оболочки кишечника. В период заболевания питательные вещества поступают в недостаточном количестве для нормального роста и развития ребенка. Восстановление функции кишечника необходимо прежде, чем ребенок сможет потреблять твердую пищу и возобновится поступление питательных веществ, чтобы восполнить отставание в росте. В качестве альтернативы другим жидкостям против обезвоживания были предложены рисовый отвар или овсяная кашица, поскольку необходимые углеводы или крахмал в этом случае поступают в легко усвояемой форме. Для демонстрации эффективности такого режима питания используется рис, меченный углеродом-13 (под действием $^{13}CO_2$ во время фотосинтеза). Меченая двуокись углерода эффективно воспринимается рисовыми зернами в форме крахмала, белка и жира. После того как рис сварен и съеден, переваривание и усвоение крахмала можно обнаружить (и измерить) по появлению меченой двуокиси углерода в пробах дыхания. Степень неусвоения можно оценить по количеству меченого углерода в стуле. Комбинация этих измерений может способствовать развитию практики восстановительного питания, основанной на местных пищевых продуктах.

Важность планирования программ по проблемам питания

Работники здравоохранения во всех странах добиваются сокращения смертности в грудном возрасте, преодоления проблем недоедания и связанной с этим задержкой в росте у детей. Они также занимаются разработкой питательной диеты для беременных и кормящих женщин и определением необходимого ежедневного потребления питательных веществ для обеспечения общей работоспособности населения. Размеры сельскохозяйственных ресурсов, необходимых для выполнения этих задач, и формы их распределения могут быть установлены после точной оценки существующих потребностей. При различии условий, уровней технической подготовки и приборного обеспечения дальнейшее развитие требует безопасных, простых и надежных методов этих измерений. По мере роста опыта применения стабильных изотопных меток увеличивается потенциал их использования для ответа на основные вопросы питания, имеющие международный характер.

Нерадиоактивные изотопные метки используются для определения потребностей в питании преждевременно родившихся младенцев (Фото Джека Дайкинга, USDA/ARS)

МАГАТЭ планирует программу координированных исследований

Опасения, связанные с радиацией, иногда ограничивают использование радиоизотопов в качестве меток в исследованиях по проблемам питания и медицины, хотя речь идет при этом об очень малых дозах. Во многих развитых странах внимание переключается на возможное применение *стабильных* изотопов, которые по своей природе настолько безопасны, что могут использоваться даже в исследованиях на грудных младенцах, детях, беременных женщинах.

Как часть работы в этой области, МАГАТЭ планирует осуществление новой программы координированных исследований по применению стабильных изотопов для изучения проблем питания человека и связанных с питанием заболеваний. Ожидается, что главное внимание в программе будет уделено измерениям белкового обмена и расхода энергии в контрольных группах населения, в основном в развивающихся странах. Предполагается также, что Агентство сможет оказать поддержку работам в этой области через проекты технического сотрудничества и предоставление стипендий.

В целом эти и другие соответствующие виды деятельности МАГАТЭ в области питания и здравоохранения направлены на раскрытие потенциальных возможностей ядерных аналитических методов и исследований с использованием изотопных меток для контроля и оценки состояния питания различных групп населения и их подверженности действию токсичных загрязнений.

Дополнительная информация может быть получена из Отдела естественных наук МАГАТЭ.