

УДК: 613.63:661.84:616-008.841.5:001.5

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ СПОЛУК ВАЖКИХ МЕТАЛІВ НА СИСТЕМУ ЗГОРТАННЯ КРОВІ В УМОВАХ IN VITRO

Губар І.В., Куповська С.І.*

ДУ «Інститут медицини праці АМН України»

*ДУ «Інститут хірургії та трансплантології ім. О.О.Шалімова»

Ключові слова: важкі метали, дослідження *in vitro*, коагулометричні показники плазми крові

Вступ

Серед хімічних речовин, що забруднюють різні об'єкти навколишнього середовища, важкі метали та їх сполуки становлять значну групу токсикантів. В індустріально розвинутих країнах та регіонах за рахунок широкого промислового використання сполук важких металів, розвитку автомобільної індустрії, хімізації побуту, забруднення ними довкілля (повітря робочої зони, атмосферне повітря, водойми, ґрунт, харчові продукти) становить загрозу для здоров'я населення [1, 2].

Висока токсичність важких металів, їх здатність накопичуватись в організмі людини та спричиняти шкідливий вплив навіть у порівняно низьких концентраціях потребують невідкладного вирішення низки гігієнічних та медико-біологічних проблем. У зв'язку з цим актуальним є пошук критеріїв ранньої діагностики патогенного впливу даних ксенобіотиків на організм [3].

Відомо, що однією з найбільш чутливих до дії важких металів є багатокомпонентна система регуляції агрегатного стану крові, що являє собою сукупність функціонально-морфологічних і біохімічних механізмів, які забезпечують гемостаз і підтримують рідкий стан крові у судинах [4-6]. Дані літератури свідчать про прямий вплив важких металів на тромбоцитарно-судинний і коагуляційний гемостаз, протизсідну і фібринолітичну системи, а також про їх здатність викликати зміни в системі регуляції агрегатного стану крові [7-14] Проте, повідомлення з цих питань небагаточисленні і потребують систематизації та подальшого вивчення.

Однією з моделей встановлення загальної токсичності хімічних сполук є білки. Порушення конформації і функціональної активності білків хімічними речовинами відбувається різними шляхами і залежить як від структури токсиканта, так і від будови та функції білка [15, 16]. Згідно даних [16, 17] денатурацію (помутніння) білка рогівки ока кролика використовують як тест для оцінки подразнювальної дії хімічної речовини (тесту Драйвера). Як альтернативний тест застосовують зміни оптичної густини білка після додавання до його розчину різних сполук. На сьогодні до речовин, що викликають денатурацію білка, відносяться луги, кислоти, окиснювачі, іони важких металів.

Метою даної роботи було експериментальне дослідження *in vitro* впливу солей важких металів на плазму крові людини (за зміною коагулометричних показників) та на її компоненти (за конформаційними змінами білків системи згортання крові).

Матеріали та методи дослідження

Дослідження впливу солей важких металів (ацетату свинцю, сульфату кадмію, хлориду ртуті, та сульфату марганцю) на систему згортання крові проводили в умовах *in vitro* за зміною коагулометричних показників плазми крові людини 0 (I) групи. Для цього стабілізовану цитратом натрію кров центрифугували при 3000 об/хв і відокремлювали плазму від формених елементів. В контрольних пробах до плазми крові додавали фізрозчин (0,9% розчину NaCl, pH 7,2) у співвідношенні 1:1. В дослідних пробах –

у такому ж співвідношенні до плазми крові додавали розчини солей важких металів на 0,9% NaCl у кінцевих концентраціях 1; 0,1; 0,01 та 0,001 моль/л. Контрольні і дослідні проби інкубували впродовж 30 хвилин в термостаті при температурі 37° С. Після інкубації за допомогою наборів реактивів фірми „CORMAY” на коагулометрі “K-3002 Optic” проводили визначення наступних показників: протромбіновий час, активований частковий тромбластиновий час (АЧТЧ) та тромбіновий час. В кожній з дослідних серій експерименту та в контрольній групі було відібрано по 6 проб.

Для оцінки денатуруючих властивостей солей важких металів *in vitro* були обрані наступні білки системи згортання крові: тромбoplastин, фібриноген та тромбін. Конформаційні зміни зазначених білків визначали спектрофотометрично за допомогою напівавтоматичного аналізатора «Screen master plus» фірми «Hospitex» (Німеччина) при довжині хвилі 405 нм. Важкі метали досліджувались у таких концентраціях: 1; 0,1; 0,01; 0,001; 0,0001 моль/л. Токсичність ксенобіотиків оцінювали за їх здатністю при додаванні до розчину білка спричинити його денатурацію, внаслідок чого зменшується прозорість (оптична густина) розчину. Розчини тромбoplastину, фібриногену та тромбіну готували на

0,9% NaCl з кінцевою концентрацією білка у реакції – 1 мг/мл. Розчин білка обережно змішували з розчином досліджуваної солі металу у співвідношенні 1:1 і інкубували протягом 2 годин при 37 °С. Для кожного білка виконували серію досліджень: 1 пробірка: 1 мл білка + 1 мл 0,9% NaCl (негативний контроль); 2 пробірка: 1 мл білка + 1 мл 0,1 М HCl на 0,9% NaCl (позитивний контроль); 3-7 пробірки: 1 мл білка + 1 мл розчину солі металу у концентраціях 1; 0,1; 0,01; 0,001; 0,0001 моль/л. Оптичну густину розчину досліджуваних проб вимірювали по відношенню до негативного контролю. Відсоток денатурації в дослідній пробі білка обчислювали відносно позитивного контролю.

Отримані дані обчислені статистично з підрахуванням *t* – критерію Ст'юдента [18].

Результати та їх обговорення

Результати проведених коагулометричних тестів (табл. 1) свідчили про наявність гіпокоагуляційних змін, що відбувались під впливом солей важких металів, а саме: подовження протромбінового та тромбінового часу, а також зростання активованого часткового тромбoplastинового часу.

Найбільш суттєві зміни показників, що характеризують згортання крові, викликав ацетат свинцю.

Таблиця 1

Коагулометричні характеристики периферичної крові людини після інкубації з розчинами солей важких металів в умовах *in vitro*

Метал/показник	Величини коагулометричних характеристик крові людини при дії різних концентрацій металів			
	Контроль (плазма крові + фізрозчин) – 16,53 ± 0,09			
Протромбіновий час, сек	1 М	0,1 М	0,01 М	0,001 М
ацетат свинцю	27,00 ± 0,44	25,07 ± 0,34	22,60 ± 0,11	19,92 ± 0,19
сульфат кадмію	20,85 ± 0,28	19,50 ± 0,12	18,02 ± 0,12	17,02 ± 0,09
хлорид ртуті	23,37 ± 0,14	21,67 ± 0,14	19,03 ± 0,14	17,93 ± 0,09
сульфат марганцю	18,40 ± 0,12	17,52 ± 0,07	17,08 ± 0,14	16,87 ± 0,05
Активованний частковий тромбластиновий час(АЧТЧ), сек	Контроль (плазма крові + фізрозчин) – 27,12 ± 0,14			
	1 М	0,1 М	0,01 М	0,001 М
ацетат свинцю	44,60 ± 0,23	38,65 ± 0,30	31,57 ± 0,34	28,93 ± 0,23
сульфат кадмію	36,22 ± 0,35	32,22 ± 0,28	28,45 ± 0,27	27,47 ± 0,25
хлорид ртуті	42,22 ± 0,32	36,27 ± 0,39	30,10 ± 0,37	28,23 ± 0,28
сульфат марганцю	32,63 ± 0,25	29,12 ± 0,30	27,85 ± 0,32	27,28 ± 0,27
Тромбіновий час, сек	Контроль (плазма крові + фізрозчин) – 6,78 ± 0,12			
	1 М	0,1 М	0,01 М	0,001 М
ацетат свинцю	15,68 ± 0,25	12,65 ± 0,30	9,93 ± 0,30	8,65 ± 0,23
сульфат кадмію	10,82 ± 0,27	9,12 ± 0,19	8,03 ± 0,14	7,42 ± 0,27
хлорид ртуті	12,35 ± 0,27	10,85 ± 0,23	8,97 ± 0,18	8,02 ± 0,16
сульфат марганцю	9,43 ± 0,21	8,08 ± 0,27	7,22 ± 0,19	6,90 ± 0,14

Примітка: * – розходження з контролем статистично значиме (p ≤ 0,05).

цю. Виявлені порушення характеризувались подовженням протромбінового часу відносно контролю за максимальної концентрації розчину солі в інкубаційному середовищі (1 М), що становило 63,34%; збільшення за цих же умов активованого часткового тромбoplastинового часу (АЧТЧ) та

тромбінового часу становило відповідно 64,45% та 131,27%. Зміни дещо меншої інтенсивності були відмічені при дії солей ртуті та кадмію. Після інкубації плазми крові з додаванням одномолярних розчинів хлориду ртуті та сульфату кадмію протромбіновий час подовжувався відповідно на 41,38% та 26,13%, АЧТЧ – на 55,68% та 33,55%, збільшення ж тромбінового часу у відсотковому вираженні становило 82,15 та 59,59. В найменшій мірі спричинив зрушення величин коагулометричних показників сульфат марганцю: виявлено зміни протромбінового часу на 11,31%, АЧТЧ та тромбінового часу відповідно на 20,32% та 39,09% після інкубації периферичної крові з 1 М розчином солі марганцю в умовах *in vitro*.

Виявлено, що при зниженні концентрацій катіонів досліджуваних солей до 0,1 моль/л та 0,01 моль/л спостерігались менш виражені відхилення величин коагулометричних показників від контрольних значень, а найнижча з використаних у дослідженнях концентрація свинцю, кадмію, ртуті та марганцю (0,001 моль/л) при додаванні до плазми крові впливала на її коагулометричні характеристики в незначній мірі.

При додаванні солей важких металів до розчинів білків системи згортання крові (тромбопластину, фібриногену, тромбіну) спостерігались зміни їх оптич-

ної густини, що свідчило про порушення структури досліджуваних білків, їх денатурацію. Виявлено, що вираженість конформаційних змін білків системи згортання крові залежала як від катіонів досліджуваних солей, так і від їх концентрації в інкубаційному середовищі (табл. 2).

Найбільш суттєві конформаційні зміни досліджуваних білків викликав ацетат свинцю: збільшення оптичної густини розчину фібриногену при дії максимальної концентрації солі свинцю в інкубаційному середовищі (1 М) становило 66,74%, конформаційні зміни тромбіну та тромбопластину визначались на рівні відповідно 79,78% і 57,89%.

Зміни білків системи згортання крові дещо меншої інтенсивності були відмічені при дії солей ртуті та кадмію. Інкубація розчинів білків з додаванням одномолярних хлориду ртуті та сульфату кадмію спричиняла наступні зміни їх оптичної густини відносно контрольних значень: фібриногену на 36,11% та 22,42%, тромбіну відповідно – на 50,32% і 27,89%; конформаційні зміни тромбопластину за цих же умов становили 33,47% і 19,26%.

Найменші зміни оптичної густини розчинів досліджуваних білків викликав сульфат марганцю в зазначеній концентрації: у відсотковому вираженні конформаційні зміни розчину фібриногену становили 6,42%, оптична густина розчинів

тромбіну та тромбопластину збільшилась відповідно на 8,95% та 4,0%.

Зниження концентрацій катіонів вищезазначених солей призводило до менш виявлених конформаційних змін білків, а найменша концентрація досліджуваних металів (0,0001 моль/л) на зміну оптичної

Таблиця 2

Відсоток денатурації білків системи згортання крові по відношенню до позитивного контролю (0,95 умов. од.)

Сполука металу	Білок/показники				
	Фібриноген				
	1М	0,1 М	0,01М	0,001 М	0,0001М
ацетат свинцю	66,74	42,32	17,79	7,47	1,47
сульфат кадмію	22,42	25,79	9,26	3,26	0,42
хлорид ртуті	36,11	29,16	9,79	4,53	0,64
сульфат марганцю	6,42	2,43	1,47	0,63	0,11
	Тромбін				
ацетат свинцю	79,78	46,42	24,11	10,63	2,11
сульфат кадмію	27,89	35,68	14,63	5,05	0,74
хлорид ртуті	50,32	37,89	12,74	8,00	1,05
сульфат марганцю	8,95	4,42	3,16	1,26	0,21
	Тромбопластин				
ацетат свинцю	57,89	30,42	8,53	4,84	0,95
сульфат кадмію	19,26	17,79	6,32	2,21	0,11
хлорид ртуті	33,47	23,47	7,37	3,05	0,21
сульфат марганцю	4,00	2,11	0,85	0,42	0,00

густини розчинів тромбопластину, фібриногену та тромбіну не впливала.

Висновки

1. Вплив сполук важких металів на коагулометричні характеристики плазми крові людини при дослідженні в умовах *in vitro* характеризувався як гіпокоагуляційний.
2. Солі важких металів *in vitro* викликали суттєві конформаційні зміни білків системи згортання крові (тромбопластину, фібриногену та тромбіну) у послідовності Pb > Hg > Cd > Mn.
3. Виявлені гіпокоагуляційні зміни плазми крові можуть бути обумовлені впливом важких металів на структуру і активність білків, що беруть участь у процесі згортання крові.

Отримані результати дослідження на моделях *in vitro* можуть бути використані з метою подальшого удосконалення існуючої системи гігієнічного нормування хімічних речовин.

Література

1. Гильденскиольд Р.С. Тяжелые металлы в окружающей среде и их влияние на организм (обзор) / Р.С. Гильденскиольд, Ю.В. Новиков, Р.С. Хамидули // Гигиена и санитария. – 1992. – №5-6. – С. 6-9.
2. Трахтенберг И.М. Тяжелые металлы как химические загрязнители производственной и окружающей среды / И.М. Трахтенберг // Довкілля та здоров'я. – 1997. – №2. – С. 48-51.
3. Еськов А.П. Токсикологические испытания. Альтернативные методы / А.П. Еськов, Р.И. Каюмов, А.Е. Соколов // Токсикол. вестник. – 2003. – №5. – С. 25-28.
4. Волков Г.Л. Современные представления о системе гемостаза / Г.Л. Волков, Т.Н. Платонова, А.Н. Савчук [и др.] // - Киев: Наукова думка, 2005. – 296 с.
5. Балуда В.П. Физиология системы гемостаза. – М.: Медицина, 1995. – 293 с.
6. Грицюк О.Й., Амосова К.М., Грицюк І.О. Практична гемостазіологія. - К.: Здоров'я, 1994. - 256 с.
7. Илюхина Л.Е. Влияние малых доз свинца на гемо- и лимфокоагуляцию. Автореф. дисс. ...канд.мед.наук:03.00.13/Институт физиологии АН Каз.ССР.-Алма-Ата, 1987.-24 с.
8. Гогина И.Ф. Экспериментальное и клиническое изучение микроциркуляции при свинцовой интоксикации / И.Ф. Гогина // Проблемы патологии в эксперименте и клинике. – 1985. – №7. – С. 177-187.
9. Carmignani M., Volpe A.R. Systemic haemodynamics as target of the chronic exposure to metals by involvement of kinin, angiotensin and/or catecholamine systems: [Pap.] 1st Eur. Congr. Pharmacol., Milan, June 16-19, 1995 // Pharmacol. Res.-1995.-Vol.31, Suppl.-P.143.
10. Зербино Д.Д., Лукасевич Л.Л. Десминированное внутрисосудистое свертывание крови. Факты и концепции. - М.: Медицина, 1989. - 335 с.
11. Бокарев И.Н., Щепотин Б.М., Ена Я.М. Внутрисосудистое свертывание крови. - К.: Здоров'я, 1989. - 298 с.
12. Egido J. Evidence suggesting a role for platelet-activating factor in experimental nephrotic syndrome / J. Egido, F. Mampaso, M. Gomez-Chiarri [et al.] // Int. J. Tissue React. – 1990. – Vol. 12, №4. – P. 213-220.
13. Кухарчук О.Л. Патогенетична роль та методи корекції інтегративних порушень гормонально-месенджерних систем регуляції гомеостазу натрію при патології нирок: Автореф. дис. ...д-ра. мед.наук: 14.03.05/ Одеський мед. ін-т. -Одеса, 1996.-37 с.
14. Подолян С.К. Вплив хлористих сполук важких металів (талію, свинцю, кадмію, ртуті) на систему регуляції агрегатного стану крові і тканинний фібриноліз. Автореф. дис. ...канд. мед. наук:14.03.04/ Буковинська державна медична академія. - Чернівці,

- 1998.- 128 с.
15. Шимановский Л.Н. Сывороточный альбумин – транспортная рецепторная система для физиологически активных веществ / Л.Н. Шимановский // Фарм. и токсикол. – 1984. – №2. – С. 93-100.
 16. Луйк А.М., Лукьянчук В.Д. Сывороточный альбумин и биотранспорт ядов. – Москва: Медицина, 1984. – 224 с.
 17. Метальникова Н.П. Связывающая способность альбумина, как показатель эффективности средств методов сорбционной детоксикации / Н.П. Метальникова, Л.Л. Громашевская, В.Л. Пономарев [и др.] // Альбумины сыворотки крови в клинической медицине / Под ред. Ю.А.Грызунова и Г.Е.Добрецова . – М.: Ириус, 1994. – С. 149-154.
 18. Минцер Е.У., Угаров О.П., Власов В.В. Методы обработки медицинской информации.-К.: Выща шк., 1991-271 с.

Реферат

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ СОЕДИНЕНИЙ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА СИСТЕМУ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ В УСЛОВИЯХ IN VITRO

Губарь И.В., Куповская С.И.

В работе приведены результаты экспериментального исследования в условиях *in vitro* влияния тяжелых металлов (свинца, кадмия, ртути и марганца) на плазму крови и ее компоненты (белки). Влияние тяжелых металлов на коагулометрические характеристики плазмы крови человека характеризовалось как гипокоагуляционное. Денатурирующие свойства солей тяжелых металлов изучались на белках системы свертывания

крови (тромбопластин, фибриноген и тромбин). Металлы вызывали существенные конформационные изменения белков в последовательности $Pb > Hg > Cd > Mn$. Выявленные гипокоагуляционные изменения плазмы крови человека могут быть обусловлены влиянием тяжелых металлов на структуру и активность белков, участвующих в процессе свертывания крови.

Ключові слова: *тяжёлые металлы, исследования in vitro, коагулометрические показатели плазмы крови.*

Summary

EXPERIMENTAL IN VITRO STUDY OF HEAVY METALS EXPOSURE ON BLOOD COAGULATION SYSTEM

Gubar I.V., Kupovska S.I.

The article presents the results of *in vitro* studies of heavy metals exposure (lead, cadmium, mercury and manganese) on blood plasma and its components (proteins). The influence of heavy metals on coagulometric characteristics of blood plasma can be described as hypocoagulating. Denaturing properties of heavy metals was studied on blood coagulation proteins (thromboplastin, fibrinogen and thrombin). Metals caused significant conformation changes in proteins in the following order $Pb > Hg > Cd > Mn$. The revealed hypocoagulation changes in human plasma can be predetermined by heavy metals exposure on the structure and activity of proteins that take part in blood coagulation process.

Key words: *heavy metals, исследования in vitro, coagulometric indexes of blood plasm.*

*Впервые поступила в редакцию 25.06.2010 г.
Рекомендована к печати на заседании
редакционной коллегии после рецензирования*