

УДК 167.2:577.1/577.17.049:001.5

ИЗУЧЕНИЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ МЕТАЛЛОВ МЕЖДУ РАЗЛИЧНЫМИ ФРАКЦИЯМИ КРОВИ ПРИ ЭКСПОЗИЦИИ Zn, Cd, Mn И Pb *IN VITRO*

Большой Д.В.

Украинский НИИ медицины транспорта МЗ Украины, Одесса

Ключевые слова: металлы, связывание с белками, кровь

Введение

Вопрос о транспорте и распределении эссенциальных и токсичных металлов в организме остаётся в центре внимания исследователей, поскольку имеет не только самостоятельное значение, но и важен для понимания токсикокинетики, механизмов биологического действия, диагностики металлопатий и выбора методов лечения. Вплотную к этому вопросу примыкает проблема пространственной локализации металлов в организме, причинах и механизмах избирательного накопления в различных органах и тканях (макрокомпартаментах), а также в клеточных органеллах (микрокомпартаментах) [1].

Основным путём и средством первичного распределения металлов в организме служит кровь. Именно в кровь попадают все экзогенные ксенобиотики, независимо от пути акцепции, именно в этой среде происходит их связывание и транспорт к органам-мишеням и биосистемам, выполняющим детоксикационные функции. В кровь также вторично поступают металлы после их мобилизации в соответствующих условиях из тканевых и клеточных депо. По этой причине кровь является одним из самых удобных и распространённых объектов анализа содержания металлов в организме и диагностики металлопатий [2].

Не вызывает сомнений тезис о том, что тяжёлые металлы в органической среде, в частности в крови, не могут находиться в свободно-ионизированной форме. Сразу после поступления в кровь извне ионы металлов свя-

зываются в хелатные комплексы с функциональными группами присутствующих органических молекул, в первую очередь белков [3]. Первичное связывание носит, как правило, неспецифический характер. При этом образуются комплексы металлов с белками, главным образом, с альбумином, которые переносятся кровью в органы и ткани, характеризуются невысокой прочностью и служат первым компонентом сложной металлотранспортной цепи [4, 5]. Невысокая прочность связывания позволяет отдавать в печени значительную часть металлов с поверхности альбумина без разрушения белковой молекулы и элиминировать их с желчью. Здесь же происходит индуцированный металлами синтез специфических низкомолекулярных транспортных белков (таких как металлотронеины) и переконформирование ионов металлов, главным образом, со свободными и доступными тиоловыми группами белков, глутатиона и других доноров. Это — вторичное, специфическое связывание металлов [6, 7]. Биологическая роль вторичного связывания металлов весьма разнопланова [7, 8] и зависит как от природы металла, так и от его концентрации и времени экспозиции.

Известно, что металлы различной природы по-разному распределяются в крови между эритроцитами и плазмой крови [9]: если одни из них находятся преимущественно в эритроцитарной массе, то другие связаны с плазматическими белками либо распределены между этими фракциями. Причины таких различий изучены недостаточно и

не могут быть объяснены лишь различием химических свойств.

Целью настоящего исследования явилось исследование различий распределения металлов во фракциях цельной крови лабораторных животных при экспозиции *in vitro* при их совместном введении как первого этапа их биотранспорта в организме.

Материалы и методы

Кровь барана (2,0 мл) была подвергнута 15-минутной экспозиции смесью металлов *in vitro* (по 0,0375 мг цинка, кадмия и марганца, а также 0,075 мг свинца в пересчёте на 1 мл крови). Затем она ультрацентрифугированием была разделена на плазму и форменные элементы крови. Форменные элементы гемолизовали в бидистиллированной воде. Из полученной смеси ультрацентрифугированием выделили тени эритроцитов (осадок - фракция 1) и надосадочную гемоглобинсодержащую фракцию (фракция 2). Плазму подвергли термообработке (15 минут на кипящей бане) для денатурации основной массы белков, после чего также разделили центрифугированием на альбуминсодержащую (осадок - фракция 3) и надосадочную фракцию (фракция 4). Известно [10], что в последней сохраняются термостабильные белки и низкомолекулярные компоненты. Такие же манипуляции были проделаны с контрольной (неэкспонированной металлами) пробой крови. В каждой из четырёх фракций экспонированной и неэкспонированной крови методом атомно-эмиссионной спектроскопии на многоканальном атомно-эмиссионном спектрометре типа ЭМАС-200 ССД определили содержание Zn, Cd, Pb и Mn. Рассчитывали средние показатели из 5 определений.

Результаты и их обсуждение

Все контрольные пробы крови и ее фракции содержали исследуемые металлы в концентрациях, приведенных в табл. 1.

Из приведенных в таблице данных видно, что распределение содержания ионов металлов в изучаемых фракциях носит однотипный характер, что подтверждается соответствующими соотношениями с минорной (3-й) фракцией. Они составили: по Zn 11,4:1,9:1,8:1,0; Cd – 17,9:0,9:13,3:1,0; Pb – 22,8:0,7:15,4:1,0; Mn – 13,5:0,7:6,5:1,0. Обращает на себя внимание более высокое, чем у эссенциального Zn, связывание с мембраной эритроцитов у Cd (на 57%) и Pb (в 2 раза), а также с термолабильными белками плазмы (преимущественно с альбумином) у Mn – в 3,6, Cd – в 7,3 и Pb – в 8,6 раз, соответственно. Эти показатели отражают функционирование металлотранспортных систем крови в физиологических условиях.

Картина существенно меняется при введении в кровь дополнительной смеси металлов, между которыми могут возникать конкурентные отношения при связывании с соответствующими лигандами. При этом соотношения металлов по фракциям (тоже к 3-й) составили: для Zn – 25,4:5,1:7,4:1,0; Cd – 24,6:5,0:9,3:1,0; Pb – 8,7:1,8:2,5:1,0; Mn – 1,6:1,3:2,2:1,0. Наиболее близкие показатели к Zn имели место у Cd, тогда как содержание Pb в 1, 2 и 4-й фракциях было в 3 раза ниже, что отражает, вероятно, физико-химические и биоло-

Таблица 1

Содержание некоторых металлов (мг/кг) в различных фракциях бараньей крови без нагрузки ("Контроль") и с нагрузкой смесью микроэлементов ("Опыт")

Фракция	Zn		Cd		Pb		Mn	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
1	14,04	61,86	1,97	41,08	15,30	90,98	3,51	10,73
2	2,34	12,46	0,10	8,33	0,45	19,27	0,18	8,96
3	1,26	18,12	0,11	15,60	0,67	26,36	0,26	14,76
4	2,26	2,44	1,45	1,67	10,34	10,43	1,70	6,75

гические закономерности, характеризующие соответствующий микроэлемент. В распределении Mn в выделенных фракциях крови различия были минимальными.

Приведенные данные о распределении микроэлементов дают представление о преимущественных биосубстратах связывания металлов во фракциях эритроцитов и плазмы крови, а также изменения их потенциальной емкости под действием примененного комплекса металлоионов. Для количественной характеристики их реального содержания в этих объектах с учетом массы и объема фракции следовало пересчитать данные на единицу объема крови. Результаты пересчета приведены в табл. 2.

Следует отметить, что удельное содержание теней эритроцитов в цельной крови, как и других фракций, рассчитывали не на массу сухого вещества, а на массу влажной фракции. Поэтому все результаты и соотношения отнесены к объёму пробы (на 1 мл крови). Анализ полученных

данных удобно проводить, если представить концентрации металлов не в абсолютных, а в относительных единицах, где за 100 % принято общее содержание соответствующего металла в 1 мл крови. Пересчитав таким образом значения таблицы 2, получаем следующие данные (табл. 3).

Если учесть, что объём осадка в первом и во втором случаях составляет менее 0,1 центрифугиру-

емой пробы, которая по эритроцитам и плазме делится на примерно равные части, то можно полагать, что во фракциях 1 и 3 содержится не 37,5% Zn, а в 2 с лишним раза больше, т.е. более 70% суммарного содержания в контроле.

Из данных табл. 3 видно, что по абсолютным значениям преобладает Zn в эритроцитах, вероятно, входящий в состав и связанный с металлоферментами (во 2-й фракции содержится 50,4% всего Zn). По Cd этот показатель существенно ниже (не более 60%). При этом следует обратить внимание на 4-ю фракцию (термостабильные белки), где содержатся металлотионеины. В ней в контроле содержится более 50% (средняя величина - 54,7%) всего металла.

Что касается Pb, то во фракции оболочек эритроцитов и содержащей альбумин фракции плазмы количество металла составляло 31,9% общего содержания, тогда как в термостабильной надосадочной жидкости (4-я фракция) обнаружено 58,1% всего свинца.

Таблица 2

Концентрации металлов (мг/мл крови), содержащихся в различных фракциях бараньей крови в пересчёте на 1 мл крови без нагрузки ("Контроль") и с нагрузкой смесью микроэлементов ("Опыт")

Фракция	Zn		Cd		Pb		Mn	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
1	0,00140	0,00619	0,00020	0,00411	0,00153	0,00910	0,00035	0,00107
2	0,00374	0,01994	0,00016	0,01333	0,00071	0,03084	0,00028	0,01434
3	0,00138	0,02355	0,00012	0,02027	0,00074	0,03427	0,00028	0,01918
4	0,00090	0,00122	0,00058	0,00084	0,00414	0,00522	0,00068	0,00337

Таблица 3

Относительные доли Zn, Cd, Pb и Mn (мг/мл крови), содержащихся в различных фракциях бараньей крови без нагрузки ("Контроль") и с нагрузкой ("Опыт"), (за 100 % принято общее содержание соответствующего металла в 1 мл крови)

Фракция	Zn		Cd		Pb		Mn	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
1	18,9	12,2	18,9	10,7	21,5	11,5	22,0	2,8
2	50,4	39,2	15,1	34,6	10,0	38,8	17,6	37,8
3	18,6	46,3	11,3	52,6	10,4	43,1	17,6	50,5
4	12,1	2,4	54,7	2,2	58,1	6,6	42,8	8,9

Для Mn характерно примерно равное распределение в 1-3 фракциях с суммарным содержанием 57,2% и доминирование в термостабильной фракции плазмы (4-я), где содержится 42,8% всего марганца.

Положение существенно изменяется после экспозиции пробы крови смесью металлов. Так, содержание Zn во всех фракциях возрастает на порядок, только во фракции теней эритроцитов увеличение составило 4,4 раза. Вероятно, высокая степень проницаемости эритроцитов для Zn (рост уровня в 5,5 раза) и большая связывающая ёмкость высокомолекулярных белков крови (рост уровня Zn в 3-й фракции в 17,1 раза!) полностью компенсируют нарушенное равновесие в системе крови по данному элементу.

Распределение избытка экзогенного Cd по направленности повторяет цинк, однако в количественном отношении существенно превосходит его. Во фракции альбумина и других высокомолекулярных белков содержание Cd выросло в 170 раз, внутри эритроцитов – в 83,3 раза и на оболочках клеток – в 20,6 раза. Эти показатели дают ясное представление о вкладе отдельных элементов крови в осуществление транспортных функций по отношению к данному металлу.

Обращает на себя внимание также тот важный факт, что отсутствие предварительной индукции синтеза металлотионеинов не приводит к сколько-нибудь существенному росту концентрации Zn и Cd в 4-й фракции (термостабильных низкомолекулярных белков). Здесь рост содержания вырос только в 1,4 раза. Следовательно, вклад этого компонента в первую фазу контакта с тяжёлыми металлами незначителен.

Существенные изменения уровня Pb определены, главным образом, во 2-й и 3-й фракциях, где рост его содержания составил 43,4 и 50,4 раза, соот-

ветственно. На клеточных мембранах эритроцитов содержание Pb также выросло в 6 раз. И только в 4-й фракции его уровень почти не изменился (рост в 1,3 раза).

По распределению во фракциях крови Mn напоминает Pb: его содержание во 2-й и 3-й фракциях возросло в 54,2 и 68,5 раз, соответственно. В 1-й фракции оно выросло в 3,1, а в 4-й – в 5,0 раз. Вероятно, во фракции термостабильных белков имеются рецепторы этого металла в достаточно больших количествах, что требует дальнейшего детального изучения.

В целом, полученный в результате проведенных *in vitro* исследований материал открывает новые аспекты взаимодействия тяжёлых металлов с компонентами крови, которая не только осуществляет первый этап в системе металлотранспорта в организме, но и отражает характер взаимодействия металлов с различными лигандами (рецепторами), что имеет важное значение для токсикокинетики и токсикодинамики экспозиции организма человека и животных тяжёлыми металлами, как и раскрытия патогенетических особенностей интоксикаций.

Выводы

1. Поступающие в кровь тяжёлые металлы в течение 15-минутной экспозиции распределяются неравномерно между её отдельными фракциями, что определяется физико-химическими и биологическими особенностями токсикокинетики отдельных элементов, механизмами связывания с лигандами и чувствительными рецепторами, и характеризует первый этап процесса транспорта тяжёлых металлов в организме.
2. Подтверждены данные литературы о преимущественном первичном связывании металлов в крови альбумином, о чём свидетельствует рост содержания в 3-й фракции Zn

— в 17,1; Cd — в 170; Pb — в 50,4; Mn — в 68,5 раз.

3. Внешняя оболочка клеток крови (тени эритроцитов) богата функциональными группами, способными связывать ионы металлов, что имеет большое значение для процессов транспорта и первичного распределения токсикантов при экспозиции тяжёлыми металлами.
4. Показана также важная роль изменения проницаемости клеточных мембран эритроцитов и способности к накоплению тяжёлых металлов внутри клеток для процессов металлотранспорта. По проникающей способности исследованные металлы распределились следующим образом: Cd > Mn > Pb > Zn, что может быть частично объяснено физиологически высоким уровнем цинка в крови и более прочным связыванием его низкомолекулярными компонентами крови.
5. Металлы в заданных концентрациях не проявляли выраженного комбинированного эффекта и проявляли способность к распределению во фракциях подобно индивидуальной экспозиции. Это является также свидетельством высокой связывающей и сорбционной способности крови и её отдельных элементов по отношению к тяжёлым металлам.

Литература

1. Громова О.А. Нейрохимия макро- и микроэлементов // О.А. Громова, А.В. Кудрин. М.: Алев-В, 2001. 300 с.
2. Камышников В.С. Клинические лабораторные тесты от А до Я и их диагностические профили. / Минск: Медпресс-информ, 2007. 320 с.
3. Swiergosz-Kowalewska R. Cadmium distribution and toxicity in tissues of small rodents. *Microsc. Res. Tech.* 2001. Nov 1; 55(3):208-22.
4. Пыхтеева Е.Г., Большой Д.В., Шафран Л.М. Роль металлотioneинов в реализации токсического действия кадмия и ртути. // II съезд токсикологов Украины // Тезисы докладов II съезда токсикологов Украины, 12-14 октября 2004 года, Киев. – С. 40-41.
5. Д.В.Большой, Е.Г.Пыхтеева, Л.М.Шафран. Связывание ионов ртути (II) белками *in vitro*. Гігієна населених місць. – Выпуск 44, 2004. С. 203-207.
6. Пыхтеева Е.Г. Специфический транспорт тяжёлых металлов в организме и его роль в патогенезе интоксикаций // Перший міжнародний конгрес «Медицина транспорту-2005». Одеса, Україна, 13-15 вересня 2005 року.
7. Шафран Л.М., Пыхтеева Е.Г., Большой Д.В. Роль металлотioneина в развитии токсических нефропатий. / / Актуальные проблемы транспортной медицины. № 2 (4), 2006. С. 76-80.
8. Л.М.Шафран, Е.Г.Пыхтеева, Д.В.Большой. Гомеостаз тяжёлых металлов: гипотезы и реальность // II Международная конференция «Гомеостаз: физиология, патология, фармакология и клиника». 28-29 сентября 2005 г. Тезисы докладов. С. 5-11.
9. Davidson T., Ke Q., Costa M. Transport of Toxic Metals by Molecular/Ionic Mimicry of Essential Compounds. – In: Handbook on the toxicology of metals / ed. By G.F. Nordberg et al. – 3-d ed. – Acad. Press, London/New York/Tokyo, 2007. - P. 79-84.
10. Levitsky D. I. Structural and functional studies of muscle proteins by using differential scanning calorimetry. - In: The Nature of Biological Systems as Revealed by Thermal Methods (Denes Lorinczy, Ed.), Kluwer Acad. Publ., Dordrecht/Boston/London, 2004, p. 127-158.

Резюме

ВИВЧЕННЯ РОЗПОДІЛУ МЕТАЛІВ МІЖ РІЗНИМИ ФРАКЦІЯМИ КРОВІ ПРИ ЕКСПОЗИЦІЇ Zn, Cd, Mn I Pb *IN VITRO*

Большой Д.В.

*Метою дослідження з'явилось вивчення відмінностей розподілу металів у фракціях цілісної крові ссавців. Кров барана (2,0 мл) була піддана 15-хвилинній експозиції сумішшю металів *in vitro* (по 0,0375 мг Zn, Cd, Mn, а також 0,075 мг Pb в перерахунку на 1 мл крові). Кров розділена на 4 фракції та в кожній з них визначені концентрації металів методом АЕС-ДА.*

Resume

STUDY OF DISTRIBUTING OF METALS BETWEEN DIFFERENT FACTIONS OF BLOOD WHEREUPON EXPOSURE OF Zn, Cd, Mn AND Pb *IN VITRO*

Bolshoy D.V.

*The purpose of the research was the distributing of metals in factions of whole blood of mammals. Blood of ram (2,0 ml) was exposed to the 15-minute of metals mixture *in vitro* (for 0,0375 mg of zinc, cadmium and manganese, and also 0,075 mg of lead in a count on 1 ml of blood). Blood parts on 4 fraction. In each of them the concentration of metals was measured by the method of AES-EAA.*

Впервые поступила в редакцию 17.12.2009 г. Рекомендована к печати на заседании редакционной коллегии после рецензирования

УДК 167.2:577.1/577.17.049:001.5

**ПОРІВНЯЛЬНА ОЦІНКА СПЕКТРАЛЬНИХ МЕТОДІВ
ВИЗНАЧЕННЯ МАКРО- ТА МІКРОЕЛЕМЕНТІВ У
БІОСЕРЕДОВИЩАХ ЛЮДИНИ**

Андрусишина І.М., Лампека О.Г., Голуб І.О.

Державна установа «Інститут медицини праці АМН України, м. Київ

Ключові слова: хімічні елементи, атомно-абсорбційна та атомно-емісійна з індуктивно зв'язаною плазмою спектрометрія.

Вступ

Сьогодні проблема встановлення зв'язку між хімічним складом оточуючого середовища і станом здоров'я населення є актуальною для багатьох країн світу. Однією з першочергових вона є і на Україні [1-3].

Головним завданням при дослідженні взаємозв'язку між вмістом МЕ та станом здоров'я людини є вибір чутливих методів аналізу та інформативних біосубстратів. Сьогодні українськими дослідниками застосовуються самі різноманітні інструментальні методи. Переважна більшість яких здатна визначати елемен-

ти - молекулярно-абсорбційними спектральними, електрохімічними, хроматографічними, радіохімічними, атомно-абсорбційними та іншими методами [4-8]. Більш сучасними є багатоелементні методи. До яких відносяться - рентгенофлуоресцентний, нейтронно-активаційний [7-9]. Останніми роками розвинулись багатоелементні методи атомно-емісійної спектрометрії з індуктивно зв'язаною плазмою (АЕС-ІЗП) та масс-спектрометрії з індуктивно зв'язаною плазмою (МС-ІЗП) [8-12].

Найбільш інформативними маркерами впливу хімічних елементів для еко-