

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

**ЛИГАНДНЫЕ ФОРМЫ ГЕМОГЛОБИНА
В ДИНАМИКЕ КАДМИЕВОЙ ИНТОКСИКАЦИИ**

**LIGAND FORMS OF HEMOGLOBIN
IN THE DYNAMICS OF CADMIUM INTOXICATION**

А.М. Эрстенюк*

A.M. Erstenyuk*

Ивано-Франковский национальный медицинский университет, Ивано-Франковск, Украина.

Ivano-Frankivsk National Medical University, Ivano-Frankivsk, Ukraine.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: кадмиевая интоксикация, оксигемоглобин, метгемоглобин, сульфгемоглобин, дисгемоглобины, кислородная емкость.

KEYWORDS: cadmium intoxication, oxyhemoglobin, methemoglobin, sulfhemoglobin, dyshemoglobin, oxygen capacity.

РЕЗЮМЕ. Исследованы биохимические механизмы адаптации организма экспериментальных животных при поступлении хлорида кадмия. Среди специфических проявлений повреждающего действия химических веществ на организм значительное место принадлежит нарушениям гемоглобина, который обеспечивает кислородтранспортную функцию, принимает участие в регуляции кислотно-щелочного равновесия, благодаря пероксидазной и каталазной активности выполняет детоксикационную функцию. Результаты спектрофотометрического исследования лигандных форм гемоглобина (окси-, мет-, сульфгемоглобина) при кадмиезе не отличаются от показателей интактных животных и соответствуют литературным данным. При комплексном изучении характеристик производных гемоглобина установлено существенное снижение уровня общего и оксигенированного гемоглобина на фоне повышения содержания мет- и сульфгемоглобина, а также суммарного количества неактивных дериватов. Наиболее существенные изменения наблюдались на 14-е сутки после окончания введения хлорида кадмия. Проведенные нами исследования указывают, что в процессе биохимической адаптации экспериментальных животных на поступление кадмия, наблюдаются существенные нарушения лигандных форм гемоглобина, что приводит к нарушению транспорта кислорода и внутриклеточного метаболизма.

ABSTRACT. Biochemical mechanisms of adaptation when entering cadmium chloride were investigated in experimental animals. In the process of biochemical adaptation of the organism an important role belongs to hemoglobin, which transports oxygen, takes part in the regulation of acid-base balance, performs the function of detoxification due to peroxidase and catalase activity. The study was carried out on male Wistar rats weighed 140–180 g, contained in standard vivarium conditions. Blood for analysis was taken under the light ether anesthesia. The animals were divided in two groups: (1) control (intact, animals were injected with 0.9% sodium chloride solution) and (2) experimental (animals were injected with cadmium chloride 1/50 LD₅₀ for 10 days). The material for the study was taken on the 1st, 7th, 14th, 21st and 28th day after completing the cadmium chloride injection. The results of the spectrophotometric study of ligand forms of hemoglobin (oxy-, met-, sulfhemoglobin) at cadmiosis do not differ from those of intact animals and comply with literature data. A comprehensive study of hemoglobin derivatives reveals a significant reduction in total and oxygenated hemoglobin accompanied by an increase in content of met- and sulfhemoglobin, as well as the total number of inactive derivatives. The most significant changes were observed on the 14th day after the injection of cadmium chloride. The study indicate that during biochemical adaptation of experimental animals to the intake of cadmium there are significant violations in the ligand forms of hemoglobin, which leads to disruption of oxygen transport and intracellular metabolism.

* Адрес для переписки:

Эрстенюк Анна Михайловна
Украина, Ивано-Франковск, 76000, ул. Галицкая, 2,
Ивано-Франковский национальный
медицинский университет,
кафедра биологической и медицинской химии
E-mail: erst@ukr.net

ВВЕДЕНИЕ

В процессах биохимической адаптации организма важная роль принадлежит гемоглобину (Хочачка, Сомеро, 1988; Стародуб и др., 1989), который обеспечивает кислородтранспортную функцию, принимает участие в регуляции кислотно-щелочного равновесия, благодаря пероксидазной и каталазной активности выполняет детоксикационную функцию. Все эти факторы определяют гомеостатические механизмы, формируют адаптационные изменения при действии различных эндо- и экзогенных факторов.

Согласно современным представлениям (Бабенко, 1999.; Шевченко, 2000; Трахтенберг, 2000) действующий экзогенный фактор любой природы, нарушая относительное постоянство внутренней среды, вызывает дестабилизацию устойчивости физиологических реакций организма. В случае воздействия на организм соединений тяжелых металлов, как правило, рассматриваются механизмы реализации токсичности в результате угнетения ими многих ферментных систем, нарушения проницаемости клеточных мембран, активации процессов свободнорадикального окисления и угнетения системы антиоксидантной защиты. Среди специфических проявлений повреждающего действия химических веществ на организм значительное место принадлежит поражениям системы крови.

Анализ литературы (Вераян и др., 1989; Губский и др., 1993; Золаев, 1997; Николаев, Лебедеенко, 1999; Скальный, 1999; Rikans, Yamano, 2000; Rana, Kumar, 2001; Магальяс и др., 2003; Кленко, 2004; Оберлис и др., 2008) выявил достаточное количество исследований, которые указывают на полноту токсического воздействия соединений кадмия. Однако первичные биохимические механизмы нарушений системы эритрона и гемоглобина, которые первыми принимают участие в реакции организма на поступление ксенобиотиков, недостаточно изучены.

В связи с этим для анализа патобиохимических изменений при интоксикации кадмием представляет интерес изучение лигандных форм гемоглобина. Для идентификации типов гемоглобина в эритроцитах используют такие параметры, как спектры поглощения гемоглобина и его производных, пероксидазную активность и образование метгемоглобина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проведены на крысах-самцах линии Вистар массой 140–180 г, содержащихся в стандартных условиях вивария. Кровь для анализа забирали под действием легкого эфирного наркоза. Животные были разделены на следующие группы: контрольная (интактная) – животным вводили физиологический раствор; опытная, животным вводили хлорид кадмия на протяжении 10 дней в дозе 1/50 ЛД₅₀.

Расчет количества хлорида кадмия проводили на основании параметров токсичности согласно литературным данным (Трахтенберг и др., 1991; Сидоренко и др., 1999).

Материал для исследования забирали на 1-е, 7-е, 14-е, 21-е и 28-е сутки после окончания введения хлорида кадмия.

Спектры лигандных форм гемоглобина определяли на спектрофотометре Specord M40 (Германия). Количественное определение содержания окси-, мет- и сульфгемоглобина проводили по спектрофотометрическим уравнениям (Сухомлинов и др., 1988).

Количество общего гемоглобина определяли при помощи стандартных наборов реактивов гемоглобинцианидным методом.

Результаты обрабатывали с использованием компьютерной программы «Statistica» (StatSoft Inc., США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для идентификации лигандов гемоглобина и определения количественного содержания отдельных форм проведено спектрофотометрическое исследование гемоглобина интактных крыс в динамике кадмиевой интоксикации (рис. 1–3).

Результаты исследования спектральных характеристик лигандных форм гемоглобина в динамике кадмиевой интоксикации позволили установить, что в эритроцитах крыс, которые использовались в эксперименте, характерные максимумы поглощения для оксигемоглобина (HbO₂) наблюдались на длинах волн 541 и 576 нм (рис. 1). Для метгемоглобина (MtHb) интактных крыс и животных в процессе интоксикации кадмием максимум поглощения наблюдался при 630 нм (рис. 2), для сульфгемоглобина (SHb) – 620 нм (рис. 3).

Таким образом, полученные результаты спектрофотометрического исследования лигандных форм гемоглобина не отличались от показателей интактных животных и соответствовали литературным данным (Сухомлинов и др., 1988; Стародуб, Назаренко, 1989), что послужило основанием для проведения количественного определения дериватов гемоглобина в динамике кадмиевой интоксикации. Такие исследования позволяют использовать экспериментальные данные для характеристики влияния различных факторов на лигандные формы и функции гемоглобина человека.

Дыхательная функция крови зависит от насыщения гемоглобина кислородом с образованием основной формы этого гемопротейна – оксигемоглобина (HbO₂). Исследование показало (рис. 4), что в процессе кадмиевой интоксикации наблюдается снижение содержания оксигемоглобина. Такие данные указывают на нарушение процессов оксигенации, что в свою очередь может привести к развитию гипоксии и нарушению метаболических процессов. Снижение уровня оксигемоглобина может быть обусловлено нарушением морфо-

функционального состояния эритроцитов, это подтверждается результатами ранее проведенных исследований липопротеинового комплекса эритроцитов и кислотными эритрограммами (Зинчук и др., 2003; Нейко и др., 2003). Такие изменения можно объяснить связыванием ионов кадмия с

SH-группами глобина, что приводит к структурно-функциональным изменениям гемоглобина. С другой стороны, ионы кадмия могут конкурентно вытеснять ионы железа гема гемоглобина. Комплекс этих факторов может привести к нарушению процессов оксигенации гемоглобина.

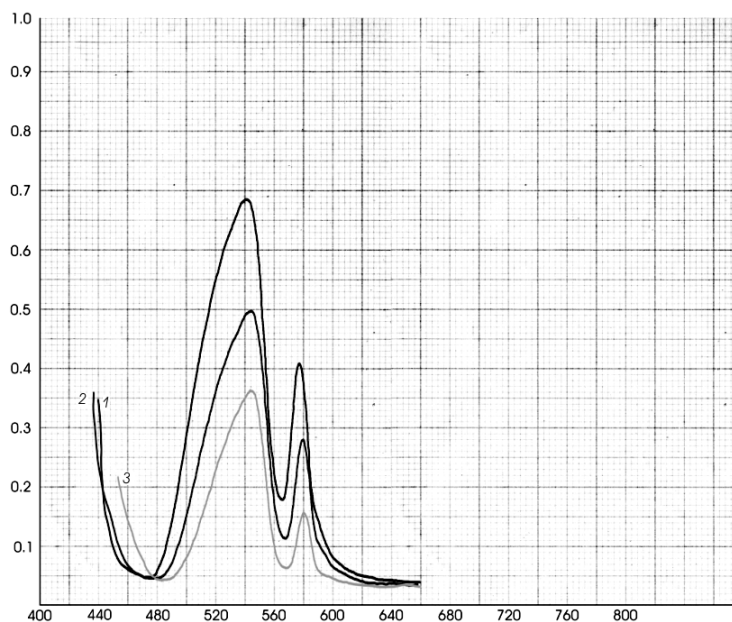


Рис. 1. Спектры оксигемоглобина intactных крыс (1) и в динамике кадмиевой интоксикации на 14-е (2) и 28-е (3) сутки эксперимента

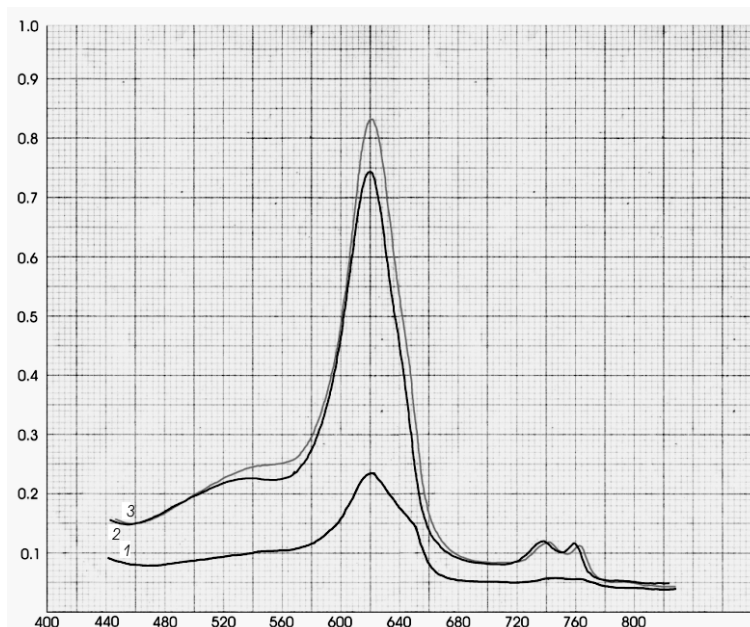


Рис. 2. Спектры метгемоглобина intactных крыс (1) и в динамике кадмиевой интоксикации на 14-е (2) и 28-е (3) сутки эксперимента

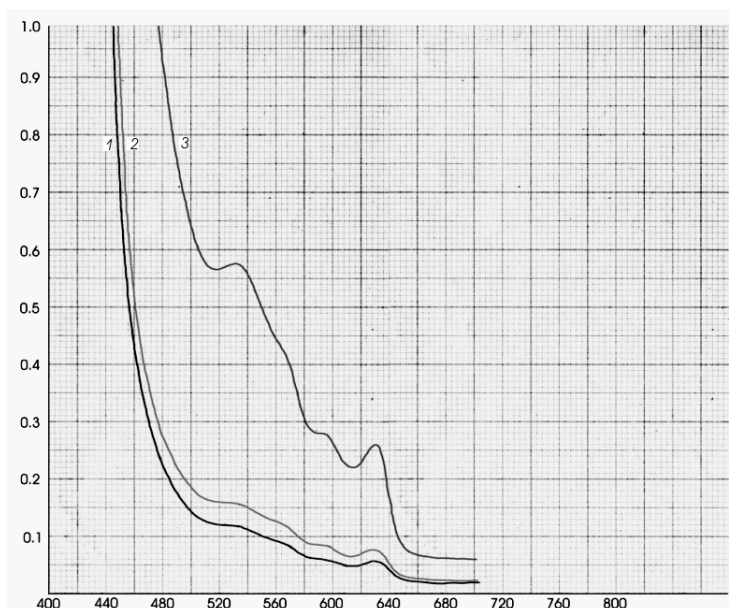


Рис. 3. Спектры сульфгемоглобина intactных крыс (1) и в динамике кадмиевой интоксикации на 14-е (2) и 28-е (3) сутки эксперимента

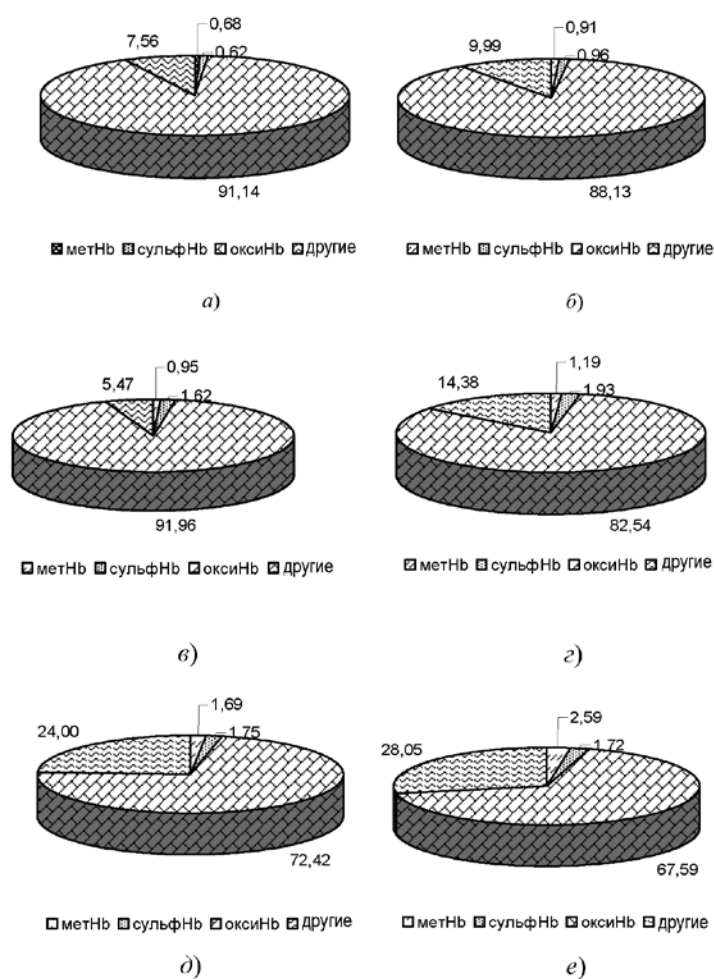


Рис. 4. Содержание (%) лигандных форм гемоглобина в крови у крыс в динамике кадмиевой интоксикации: а – intactная группа; б – 1-е сутки после окончания введения хлорида кадмия; в – 7-е; г – 14-е; д – 21-е; е – 28-е сутки

Исследование других лигандных форм гемоглобина показало, что в процессе кадмиевой интоксикации существенно возрастает уровень метгемоглобина. Метгемоглобин образуется в результате окисления гемоглобина и сопровождается образованием супероксид-аниона, который инициирует образование других активных и цитотоксических форм кислорода, приводит к нарушению насыщения гемоглобина кислородом. Накопление MtHb при кадmioзе может быть обусловлено нарушением биохимических процессов его восстановления до гемоглобина. Метгемоглобин восстанавливается специальным ферментом – НАДН-метгемоглобинредук-тазой (Лукьяненко, Слобожанина, 2002), восстановленный НАД образуется в реакции дегидрирования глицеральдегидфосфата в процессе гликолиза. Исследование активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) эритроцитов (Губский, Ерстенюк, 2003) в динамике кадмиевой интоксикации указывает на снижение активности этого фермента; такие результаты подтверждаются в работе (Ansa, 1973), где указывается на ингибирование кадмием окислительно-восстановительной пары пируват/лактат и НАД-зависимых дегидрогеназных реакций. Вероятно, нарушение восстановления метгемоглобина можно рассматривать как один из первичных биохимических механизмов токсического действия соединений кадмия, что приводит к развитию оксидативного стресса, нарушению структуры и

функции белков и липидов, энергообеспечения эритроцитов.

При изучении уровня сульфгемоглобина (SHb) крыс в динамике кадmioза нами установлено повышение этой формы гемоглобина на протяжении всего эксперимента, наиболее высокое содержание наблюдалось на 14-е сутки. В этой группе животных концентрация общего гемоглобина была наиболее низкой. Известно, что сульфгемоглобин образуется в результате разрыва метинового мостика гема, при этом происходит необратимое нарушение структуры гемоглобина с освобождением ионов железа, которые могут инициировать свободно-радикальные процессы.

Скорость и полнота переноса кислорода зависят от комплекса факторов, среди которых решающим выступает содержание его лигандных форм. Некоторые авторы указывают на то, что снижение в крови общего гемоглобина и повышенное содержание мет-, сульф- и других дисгемоглобинов приводит к повышению сродства гемоглобина к кислороду, снижению диссоциации оксигемоглобина (Моран, 1998; Зинчук и др., 2003).

Анализ суммарного содержания дисгемоглобинов крыс при кадмиевой интоксикации показал его повышение в 3,6 раза, по сравнению с контрольной группой животных. Такие изменения в системе гемоглобина привели к снижению кислородной емкости крови животных (рис. 5), и как следствие – к развитию гемической гипоксии.

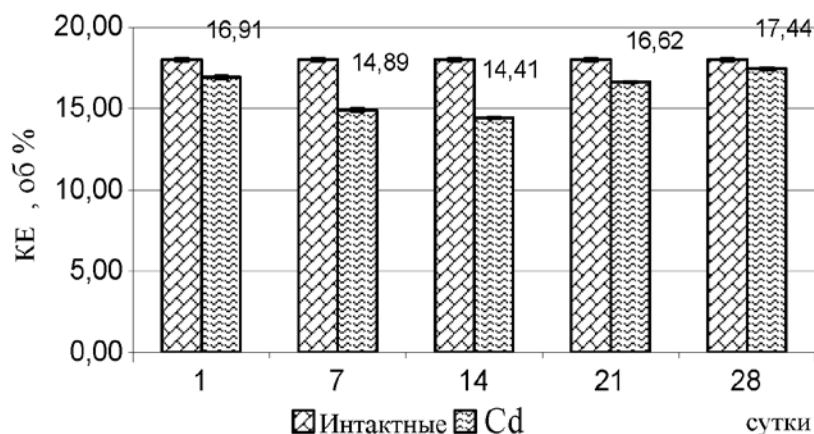


Рис. 5. Кислородная емкость крови крыс в динамике кадмиевой интоксикации

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проведенные нами исследования указывают, что в процессе биохимической адаптации экспериментальных животных к поступлению кадмия наблюдаются существенные нарушения лигандных форм гемоглобина. Такие изменения сопровождаются накоплением неактивных дериватов: мет- и сульфгемоглобина на фоне снижения оксигемоглобина, что приводит к снижению кислородной емкости крови, нарушению транспорта кислорода и внутриклеточного метаболизма.

ЛИТЕРАТУРА

- Бабенко Г. Биосфера, антропогенез і здоров'я. Івано-Франківськ. 1999. 198 с.
- Веранян О.А., Волкова Н.А., Карплюк И.А. Влияние кадмия на организм при различном содержании белка в рационе // Вопросы питания. 1989. № 2. С. 33–37.
- Шевченко Ю.Л. (ред.) Гипоксия: адаптация, патогенез, клиника ЭЛБИ-СПб. 2000. 383 с.
- Губский Ю.И., Левицкий Е.Л., Ленчевская Л.К. Влияние хлористого кадмия на ДНК-, РНК-полимеразную активность и перекисное окисление липидов фракций хро-

тина печени крыс // Украинский биохимический журнал. 1993. Т. 65. № 5. С. 112–115.

Губський Ю.І., Ерстенюк Г.М. Система “лактатдегідрогеназа-метгемоглобін” та окиснювальна модифікація білків еритроцитів за умов кадмієвої інтоксикації // Мед. хімія. 2003. Т. 5. № 1. С. 9–12.

Зинчук В.В., Максимович Н.А., Борисюк М.В. Функциональная система транспорта кислорода: фундаментальные аспекты. Гродно.: ГрГМУ. 2003. 236 с.

Золаев Р.В. Влияние кадмия и цинка на состояние органов полости рта у лиц, занятых их производством: Автореф. дис... канд. мед. наук. М. 1997. 23 с.

Ерстенюк Г.М. Вплив хлориду кадмію на систему еритрону // Експериментальна фізіологія та біохімія. 2002. № 2. С. 25–29.

Кленко А.В. Енергетичний стан еритроцитів слизової оболонки тонкої кишки щурів за сумісної дії іонізуючої радіації: Автореф. дис... канд.біол.наук. Київ. 2004. 20 с.

Лукьяненко Л.М., Слобожанина Е.И. Окислительный стресс в эритроцитах и активность мембранно-связанной NADH-метгемоглобинредуктазы // Укр. біохім. журнал. 2002. Т. 74, № 46. С. 57.

Магальяс В.М., Тащук К.Т., Радько М.М., Рудницький Р.І., Перепелюк М.Д. Загальні закономірності нефротоксичної дії кадмію, талію, платини та ртуті // Мед. хімія. 2003. Т. 5. № 2. С. 104–105.

Моран Р. Лабораторная оценка снабжения тканей кислородом: газы крови и СО-метрия (лекция) // Клинич. лабор. диагностика. 1998. № 2. С. 25–32.

Нейко Є.М., Губський Ю.І., Ерстенюк Г.М. Інтоксикація кадмієм: токсикокінетика і механізм біоцидних ефектів // Журнал АМН України. 2003. Т. 9. № 2. С. 250–261.

Николаев В.А., Лебеденко И.Ю. Токсикология кадмия // Проблемы стоматологии и нейростоматологии. 1999. № 1. С. 48–53.

Оберлис Д., Харланд Б., Скальный А. Биологическая роль макро- и микроэлементов у человека и животных. СПб.: Наука. 2008. 544 с.

Сидоренко Г.И., Можяев Е.А., Кутепов Е.Н. Зависимость токсичности катионов от плотности соответствующих химических элементов // Гигиена и санитария. 1999. № 5. С. 49–50.

Скальный А.В. Микроэлементозы человека (диагностика и лечение). Москва. 1999. 96 с.

Стародуб Н.Ф., Назаренко В.И. Гетерогенная система гемоглобина. Киев: Наукова думка. 1989. 198 с.

Сухомлинов Б.Ф., Тиунов Л.А., Лукьянец В.М., Дудок Е.П., Бородавко В.К., Федорович А.Н., Бурда В.А. Спектрофотометрическое исследование лигандных форм гемоглобина в одной пробе крови // Молекулярные механизмы действия экстремальных факторов на структурно-функциональные свойства биологических макромолекул. Львов. 1988. С. 36–42.

Трахтенберг И.М., Сова К.Е., Шефгель В.О., Онищенко Ф.А. Проблемы нормы в токсикологии. М.: Медицина. 1991. 208 с.

Трахтенберг И. Книга о ядах и отравлениях (Очерки токсикологии). Киев: Наукова думка. 2000. 366 с.

Хочачка П., Сомеро Дж. Биохимическая адаптация. М.: Мир. 1988. 567 с.

Rana S.V., Kumar A. Effect of cadmium and zinc-metallothionein on methemoglobin and nitric oxide in dimethylnitrosamine treated rats. // Indian J Exp Biol. 2001. 39(5): 487–489.

Rikans L.E., Yamano T. Mechanisms of cadmium-mediated acute hepatotoxicity // J. Biochem. Mol. Toxicol. 2000. 14(2): 110–117.

Anca Z. Actiunea ionilor de cadmiu asupra unor sisteme de dehidrogenare pe rinichi izolat si perfuzat la sobolani // Studii si cercetari de biochimie. 1973. 16(1): 5–8.