

ВПЛИВ КАДМІЮ НА ПОПУЛЯЦІЙНИЙ СКЛАД І КИСЛОТНУ РЕЗИСТЕНТНІСТЬ ЕРИТРОЦИТІВ ЩУРІВ

Г. Л. Антоняк¹, Ю. В. Жилищич², Н. Є. Панас²

¹Львівський національний університет імені Івана Франка

²Львівський національний аграрний університет

Досліджували вплив катіонів Cd^{2+} на відносний вміст популяції еритроцитів у крові щурів та стійкість цих клітин до кислотного гемолізу. Установлено, що за умов щодобового надходження кадмію в складі $CdCl_2$ (із розрахунку 1,8 мг Cd на 1 кг живої маси) впродовж 28-ми діб у крові тварин збільшується відносний вміст фракції старих еритроцитів та зменшується кислотна резистентність еритроїдних клітин. Такі ефекти свідчать про активацію процесу старіння еритроцитів, дестабілізацію плазматичних мембран еритроїдних клітин та порушення кисень транспортної функції крові тварин під впливом кадмію.

Сполуки важких металів належать до розповсюджених у довкіллі полютантів антропогенного походження. Одним із токсичних металів є кадмій, який із компонентів навколишнього середовища може потрапляти в рослинні корми та продукти харчування, надходити в організм сільськогосподарських тварин і людини, спричиняючи порушення у процесах клітинного метаболізму [1, 18]. Відомо, що кадмій може заміщувати есенціальні елементи (зокрема, Zn) у структурі деяких металопротеїнів, а, крім того, через високу спорідненість до сульфгідрильних груп інактивує SH-вмісні ензими та білки, задіяні у життєво важливих процесах [20, 22].

Значне зацікавлення викликає вплив катіонів кадмію на гемопоез і процес транспорту кисню в організмі тварин і людини. Упродовж 90-х років ХХ ст. установлено, що за умов тривалого надходження кадмію у людей і тварин розвивається анемія внаслідок порушення синтезу еритропоетину — регулятора еритропоезу [15]. Проте вплив цього металу на метаболізм у клітинах крові та функціональні властивості мембран еритроцитів нині досліджений недостатньо. Разом із тим, відомо, що структурно-функціональний стан мембран визначає форму, розмір, здатність до деформації та ступінь агрегації еритроцитів і значно впливає на кисень-транспортну функцію гемоглобіну [11, 17]. Деякі патологічні стани супроводжуються дестабілізацією мембран еритроцитів, а в окремих випадках — руйнуванням цих клітин у кровообігу [14, 16, 17]. Особливо це стосується старих еритроцитів, які характеризуються меншою стійкістю плазматичних мембран, аніж молоді та зрілі еритроїдні клітини [9].

Як відомо, функціональний стан мембран еритроцитів та його порушення під впливом різноманітних чинників, у тому числі важких металів, можна проаналізувати, досліджуючи резистентність клітин до гемолізу в кислотному середовищі [3, 7]. Тому метою роботи було дослідити вплив катіонів Cd^{2+} на популяційний склад еритроцитів крові та кислотну резистентність цих клітин за умов тривалого надходження кадмію хлориду в організм щурів.

Матеріали і методи. Експерименти проводили на безпородних білих щурах-самцях масою 160–180 г, яких утримували за умов віварію. Щурів поділили на 5 груп: контрольну (К, 10 особин) і 4 дослідні (Д1-Д4, по 5 особин у кожній). Тваринам груп Д1, Д2, Д3 і Д4 вводили розчин $CdCl_2$ із розрахунку 1,8 мг Cd на 1 кг живої маси щодоби за допомогою внутрішньошлункового зонда упродовж 7-ми, 14-ти, 21-ї і 28-ми діб, відповідно. Щурам

контрольної групи вводили фізіологічний розчин у такому ж самому об'ємі. Матеріалом досліджень була змішана периферична кров, яку отримували шляхом декапітації щурів дослідних і контрольної груп. Всі процедури та забій тварин проводили, дотримуючись вимог «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних і наукових цілей» (Страсбург, 1985), та згідно із Законом України «Про захист тварин від жорстокого поводження» від 21.02.2006 р.

Еритроцити виділяли із гепаринізованої крові центрифугуванням на рефрижераторній центрифугі при 2500 g впродовж 15 хв. Плазму відбирали, а еритроцити тричі промивали 0,85 % NaCl, щоразу центрифугуючи клітини при 3000 g впродовж 5 хв [5]. Популяції еритроцитів різного віку отримували фракціонуванням суспензій клітин у градієнті густини сахарози [6]. Метод базується на змінах плавучої густини еритроцитів під час дозрівання та старіння клітин. Фракції еритроцитів, близьких за морфо-функціональними характеристиками, об'єднували у три популяції (молоді, зрілі та старі клітини). Відносний вміст еритроцитів кожної фракції визначали на основі спектрофотометричного аналізу.

Кислотну резистентність еритроцитів визначали методом кислотних еритрограм, досліджуючи кінетику гемолізу еритроцитів залежно від їхньої резистентності до гемолітика (0,004 н HCl) [3]. Отримані результати опрацьовували статистично за допомогою комп'ютерних програм.

Результати й обговорення. Фракціонуванням суспензії еритроцитів у градієнті густини сахарози та аналізом відносного вмісту молодих, зрілих і старих клітин встановлено, що під впливом катіонів Cd²⁺ у крові щурів відбуваються зміни популяційного складу еритроцитів (табл.). Зокрема, це стосується фракції старих еритроцитів, частка яких у крові тварин дослідних груп зростає на 36,1–30,5 % у період із 14-ї по 28-му добу введення CdCl₂ (p<0,05–0,01).

Таблиця

Відносний вміст різновікових популяцій та швидкість гемолізу еритроцитів у крові щурів, яким вводили CdCl₂ (M±m; n=5–10)

Групи тварин	Відносний вміст еритроцитів окремих фракцій, %			Час гемолізу 50 % еритроцитів, хв.
	Молоді	Зрілі	Старі	
Контрольна	22,0±0,9	60,0±2,3	18,0±0,8	3,7±0,3
Д1	25,5±1,1*	53,5±2,2	21,0±1,2	2,80±0,2*
Д2	23,5±1,2	52,0±1,8*	24,5±1,2**	2,2±0,2**
Д3	21,5±0,9 [#]	54,5±2,6	24,0±1,5*	1,8±0,2**
Д4	19,5±1,3 [#]	57,0±2,4	23,5±1,0**	-

Примітка: *, ** — вірогідність різниць у значеннях показників між контрольною і дослідними групами тварин (* — p<0,05; ** — p<0,01); [#] — вірогідність різниць у показниках між дослідними групами тварин Д1 і Д3, Д1 і Д4 (p<0,05).

Відносний вміст зрілих еритроцитів, які загалом є найстабільнішою фракцією клітин, вірогідно зменшується у крові щурів групи Д2, яким упродовж 14 діб вводили кадмію хлорид (p<0,05). Що стосується молодих еритроїдних клітин, то їхня частка зростає на 15 % (p<0,05) у щурів групи Д1 порівняно з контрольною групою. Такий ефект може зумовлюватись інтенсивним вивільненням ретикулоцитів із пулу, що міститься в кістковому мозку, і може являти собою реакцію системи еритропоезу на дію стресу, що супроводжується гормональними змінами в організмі тварин [19]. Водночас, незважаючи на відсутність вірогідних змін відносного вмісту молодих еритроцитів у щурів груп Д3 і Д4 порівняно з контролем, цей показник у щурів зазначених груп зменшується порівняно з таким, що притаманний тваринам групи Д1 (p<0,05).

Загалом аналіз отриманих результатів щодо динаміки популяційного складу еритроїдних клітин вказує на прискорення процесів старіння еритроцитів у крові тварин, яким вводили кадмію хлорид. Такий ефект зумовлює погіршення кисень-транспортної функції крові, оскільки в старих еритроцитах менша активність ензимів гліколізу та антиоксидантної системи, більший вміст метгемоглобіну, ніж у молодих і зрілих клітинах [2, 8, 21]. Інтенсифікація процесів старіння еритроцитів під впливом кадмію може опосередковуватись змінами, які відбуваються і на рівні внутрішньоклітинного метаболізму, і на рівні плазматичних мембран [13].

Одним із показників, що характеризують стабільність мембран за фізіологічних умов та впливу різноманітних стресових чинників, є резистентність еритроцитів до кислотного гемолізу [7, 10]. Хоча гемолітична стійкість нефракціонованих еритроцитів крові насамперед визначається структурно-функціональними особливостями мембран зрілих еритроцитів, зміни кислотної резистентності певною мірою віддзеркалюють динаміку різновікових популяцій еритроїдних клітин у кровообігу. Такий ефект зумовлюється тим, що під час старіння еритроцитів зростає рівень оксидативних пошкоджень, денатурації та агрегації мембранних білків, утворення комплексів спектрину з гемоглобіном, що дестабілізує білковий спектр мембран, збільшує їхню проникність для іонів та чутливість до гемолізу [8, 12]. Молоді еритроцити, навпаки, характеризуються високою стійкістю до гемолітиків [8]. Тому для аналізу змін у кисень-транспортній системі крові, зумовлених тривалим надходженням кадмію в організм тварин, досліджували кінетику гемолізу еритроцитів щурів контрольної і дослідних груп за наявності в середовищі 0,004 н НС1.

Результати аналізу форми еритрограм та показника швидкості гемолізу (час гемолізу 50 % еритроцитів) свідчить про зміни функціональних властивостей мембран еритроїдних клітин щурів, які зазнавали тривалого впливу кадмію хлориду (рис., табл.). Насамперед, необхідно відмітити значне зміщення максимуму еритрограм тварин дослідних груп ліворуч порівняно з контролем. Такий ефект виявляється, починаючи з 7-ї доби після початку експерименту, однак найвиразніше — у щурів групи Д3, яким вводили $CdCl_2$ впродовж 21-ї доби (рис. А). Час гемолізу 50 % еритроцитів у тварин групи Д1 зменшується на 24,3 % ($p < 0,05$), у щурів груп Д2 і Д3 — відповідно, на 40 і 52 % ($p < 0,01$, табл.).

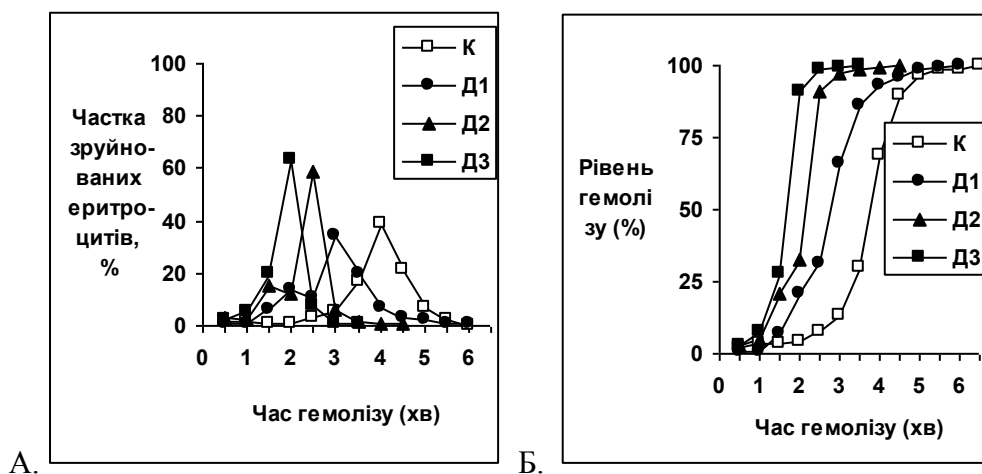


Рис. Типові еритрограми щурів контрольної і дослідних груп

Разом із зміщенням максимуму еритрограм по ординаті часу у щурів дослідних груп змінюється форма кривих гемолізу еритроцитів. Зокрема, у щурів групи Д1 висота максимуму еритрограми зменшується, а у тварин груп Д2 і Д3 — значно збільшується порівняно з контролем. Водночас для кривих гемолізу еритроцитів щурів дослідних груп

характерна наявність локального максимуму в лівій частині еритрограм. Це свідчить про збільшення вмісту клітин зі зниженою стійкістю мембрани, тобто старих еритроцитів [8]. Такі дані узгоджуються з отриманими результатами щодо фракційного розподілу еритроїдних клітин у крові щурів, яким вводили кадмію хлорид (табл.).

Загалом результати проведених досліджень свідчать про вплив катіонів Cd^{2+} на функціональну активність еритроцитів та погіршення кисень транспортної функції клітин крові за умов надходження кадмію в організм тварин. Важливу роль в установлених ефектах може відігравати активація процесів пероксидного окиснення ліпідів та модифікація структури мембранних білків еритроцитів внаслідок зумовленого кадмієм оксидативного стресу [1, 4, 22].

ВИСНОВКИ

Надходження кадмію хлориду в організм тварин (1,8 мг Cd на 1 кг живої маси щодоби) призводить до змін популяційного складу еритроцитів у кровообігу, впливає на структурно-функціональні властивості плазматичних мембран, спричиняє прискорення процесів старіння еритроїдних клітин та зменшення їхньої стійкості до гемолізу. Найвиразніше збільшення відносного вмісту старих еритроцитів у кровообігу щурів, яким вводили CdCl_2 , відбуваються на 14-ту і 21-шу доби експерименту. Такий ефект супроводжується істотним зменшенням кислотної резистентності еритроцитів тварин у зазначені терміни досліджень.

Перспективи подальших досліджень. Перспективою подальших досліджень є з'ясування шляхів профілактики а корекції зумовлених кадмієм порушень застосуванням ефективних антиоксидантів, енеросорбентів та інших коригувальних чинників

EFFECT OF CADMIUM ON THE POPULATION STRUCTURE AND ACID RESISTANCE OF RAT ERYTHROCYTES

H. L. Antonyak¹, Yu. V. Zhylishchych², N. E. Panas²

¹Lviv Ivan Franko National University

²Lviv National Agrarian University

S U M M A R Y

The effects of Cd^{2+} on relative content of red blood cell fractions in rats and resistance of erythrocytes to hemolysis were studied. It was established that daily intake of cadmium chloride (1.8 mg Cd per 1 kg of body weight) for 28 days caused an increase in relative content of old erythrocytes and decrease of erythroid cell acid resistance. These effects suggest the activation of red blood cell aging, destabilization of erythrocyte membrane and deterioration of oxygen transport function of animal blood under the influence of cadmium.

ВЛИЯНИЕ КАДМИЯ НА ПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ И КИСЛОТНУЮ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ КРЫС

Г. Л. Антоняк¹, Ю. В. Жылищич², Н. Э. Панас²

¹Львовский национальный университет имени Ивана Франко

²Львовский национальный аграрный университет

А Н Н О Т А Ц И Я

Изучали влияние катионов Cd^{2+} на относительное содержание популяций эритроцитов в крови крыс и устойчивость этих клеток к кислотному гемолизу. Установлено, что в условиях ежесуточного поступления кадмия в составе $CdCl_2$ (из расчета 1,8 мг Cd на 1 кг живой массы) в течение 28 суток в крови животных увеличивается относительное содержание фракции старых эритроцитов и уменьшается кислотная резистентность эритроидных клеток. Такие эффекты свидетельствуют об активации процесса старения эритроцитов, дестабилизации плазматических мембран эритроидных клеток и нарушения кислородтранспортной функции крови животных под влиянием кадмия.

Л І Т Е Р А Т У Р А

1. Антоняк Г. Л. Кадмій в організмі людини і тварин: І. Надходження до клітин і акумуляція / Г. Л. Антоняк, Л. П. Білецька, Н. О. Бабич та ін. // Біологічні студії. — 2010. — Т. 4, № 2. — С. 39–52.
2. Антоняк Г. Л. Залізо в організмі людини і тварин (біохімічні, імунологічні та екологічні аспекти) / Г. Л. Антоняк, Л. І. Сологуб, В. В. Снітинський, Н. О. Бабич. — Львів, 2006. — 310 с.
3. Гительзон И. И. Эритрограммы как метод клинического исследования крови / И. И. Гительзон, И. А. Терсков. — Красноярск, 1959. — 247 с.
4. Жилищич Ю. В. Динаміка гематологічних показників у щурів за умов введення хлориду кадмію / Ю. В. Жилищич, Г. Л. Антоняк // Вісник Львівського державного аграрного університету. — 2007. — Агрономія, № 11. — С. 312–316.
5. Козловская Л. В. Учебное пособие по клиническим лабораторным методам исследования / Л. В. Козловская, А. Ю. Николаев. — М. : Медицина, 1984. — 288 с.
6. Сибірна Н. О. Цитологічні та фізико-хімічні методи дослідження крові : методичний посібник / Н. О. Сибірна, М. М. Великий. — Львів : Ред.-вид. відділ. Львів. ун-ту, 1997. — 69 с.
7. Чернецкий Г. А. Способы определения резистентности эритроцитов / Г. А. Чернецкий. — Минск : Наука-Белорус, 2002. — 101 с.
8. Bartosz G. Erythrocyte aging / G. Bartosz // Adv. Cell Aging Gerontol. — 1996. — Vol. 1. — P. 63–88.
9. Bosman G. Erythrocyte ageing in vivo and in vitro: structural aspects and implications for transfusion / G. Bosman, J. M. Werre, F. L. Willekens, V. M. Novotny // Transfus. Med. — 2008. — Vol. 18. — P. 335–347.
10. Chernenkov I. V. Acid resistance of erythrocytes in children with chronic inflammatory diseases of the stomach and duodenum during the course of the hyperbaric oxygenation / I. V. Chernenkov, T. I. Grozdova, I. I. Popova // Eksp. Klin. Gastroenterol. — 2013. — N 1. — P. 25–28.
11. Gov N. S. Red blood cell membrane fluctuations and shape controlled by ATP-induced cytoskeletal defects / N. S. Gov, S. A. Safran // Biophys. J. — 2005. — Vol. 88, N 3. — P. 1859–1874.

12. *Hale J. P.* Effect of hydroperoxides on red blood cell membrane mechanical properties. / J. P. Hale, C. P. Winlove, P. G. Petrov // *Biophys J.* — 2011. — Vol. 101, N 8. — P. 1921–1929.
13. *Hess J. R.* Red blood cell hemolysis during blood bank storage: using national quality management data to answer basic scientific questions / J. R. Hess, R. L. Sparrow, P. F. van der Meer et al. // *Transfusion.* — 2009. — Vol. 49. — P. 2599–2603.
14. *Hirt-Minkowski P.* Atypical hemolytic uremic syndrome: update on the complement system and what is new / P. Hirt-Minkowski, M. Dickenmann, J. A. Schifferli // *Nephron Clin. Pract.* — 2010. — Vol. 114, N 4. — P. 219–235.
15. *Horiguchi H.* Long-term cadmium exposure induces anemia in rats through hypoinduction of erythropoietin in the kidneys / H. Horiguchi, M. Sato, N. Konno, M. Fukushima // *Arch. Toxicol.* — 1996. — Vol. 71, N 1–2. — P. 11–19.
16. *Karasawa T.* Metabolome analysis of erythrocytes from patients with chronic hepatitis C reveals the etiology of ribavirin-induced hemolysis / T. Karasawa, T. Saito, Y. Ueno, M. Sugimoto // *Int. J. Med. Sci.* — 2013. — Vol. 10, N 11. — P. 1575–1577.
17. *King M. J.* Rapid flow cytometric test for the diagnosis of membrane cytoskeleton-associated haemolytic anaemia / M. J. King, J. Behrens, C. Rogers et al. // *Br. J. Haematol.* — 2000. — Vol. 111. — P. 924–933.
18. *Maret W.* The bioinorganic chemistry of cadmium in the context of its toxicity / W. Maret, J. M. Moulis // *Met. Ions Life Sci.* — 2013. — Vol. 11. — P. 1–29.
19. *Min Z.* Study on the relationship between cadmium chloride-induced adrenocortical cell of guinea pig apoptosis and stress-activated protein kinase activity / Z. Min, Y. Xingfen, W. Qing et al. // *Exp. Toxicol. Pathol.* — 2008. — Vol. 60, N 6. — P. 459–468.
20. *Moulis J. M.* Cellular mechanisms of cadmium toxicity related to the homeostasis of essential metals / J. M. Moulis // *Biometals.* — 2010. — Vol. 23, N 5. — P. 877–896.
21. *Rettig M. P.* Evaluation of biochemical changes during in vivo erythrocyte senescence in the dog / M. P. Rettig, P. S. Low, J. A. Gimm et al. // *Blood.* — 1999. — Vol. 93, N 1. — P. 376–384.
22. *Wan L.* Cadmium toxicity: effects on cytoskeleton, vesicular trafficking and cell wall construction / L. Wan, H. Zhang // *Plant Signal Behav.* — 2012. — Vol. 7, N 3. — P. 345–348.