

## ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ РАЗЛИЧНЫХ СОЛЕЙ КОБАЛЬТА И КАДМИЯ НА КИСЛОТНУЮ УСТОЙЧИВОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ

Сизенцов А.Н.<sup>1</sup>, Филончикова Е.С.<sup>1</sup>, Быкова Л.А.<sup>1</sup>, Сальникова Е.В.<sup>1</sup>, Бибарцева Е.В.<sup>1</sup>, Побегайлова И.Г.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет», Оренбург, e-mail: asizen77@mail.ru

Способность эритроцитов к гемолизу под действием гемолитических веществ используется в качестве критерия, определяющего стойкость клеток. При этом величиной для оценки стойкости служит время гемолиза. Время гемолиза эритроцитов находится в прямой зависимости от концентрации гемолитического агента. Неорганические кислоты в ряду гемолитиков являются наиболее стабильными. Именно поэтому стойкость эритроцитов к кислотному гемолизу является важнейшим критерием, который связан с их физиологическим состоянием и возрастом, а также отражает состояние мембраны клетки. Известно, что гемолиз эритроцитов человека, вызываемый 0,002М раствором HCl, в норме протекает от 6 до 8 минут. В статье представлены данные по изучению влияния солей кобальта и кадмия на кислотную устойчивость эритроцитов. В ходе проведенных исследований было установлено, что наибольшим повреждающим эффектом на устойчивость мембран эритроцитов в отношении кислот обладает соль  $Cd(CH_3COO)_2 \times 2H_2O$ , поскольку данный образец достигает 100% гемолиза за 1,5 минуты, что на 6,5 минут ранее контрольного образца, что в свою очередь свидетельствует о низкой устойчивости мембран при воздействии данного химического соединения. Наименьшим токсическим действием обладает хлорид кадмия, так как процесс гемолиза прекращается через 9,5 минут, что на 1,5 минуты позднее контрольного образца. Также наименьшим токсическим эффектом на устойчивость мембран эритроцитов к кислотам обладают оксиды Co и Cd, что, на наш взгляд, связано с низким уровнем диссоциации данных соединений.

Ключевые слова: эритроцит, мембранная устойчивость, кобальт, кадмий, кислотная резистентность, гемолиз, кислотная эритрограмма.

## STUDY OF INFLUENCE OF VARIOUS SALTS OF COBALT AND CADMIUM ON ACID STABILITY OF ERYTHROCYTES

Sizentsov A.N.<sup>1</sup>, Filonchikova E.S.<sup>1</sup>, Bykova L.A.<sup>1</sup>, Salnikova E.V.<sup>1</sup>, Bibartseva E.V.<sup>1</sup>, Pobegailova I.G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>FGBOU IN "The Orenburg state university", Orenburg, e-mail: asizen77@mail.ru

The ability of erythrocytes to hemolysis under the influence of hemolytic substances is used as a criterion determining the resistance of cells. In this case, the value for assessing the resistance is the hemolysis time. The hemolysis time of red blood cells is directly dependent on the concentration of the hemolytic agent. Inorganic acids in the hemolytic series are the most stable. That is why the resistance of red blood cells to acid hemolytic is the most important criterion that is related to their physiological state and age, as well as reflecting the state of the cell membrane. It is known that the hemolysis of human erythrocytes, caused by 0.002 M HCl solution, normally lasts from 6 to 8 minutes. The article presents data on the effect of salts of cobalt and cadmium on the acid resistance of erythrocytes. In the course of the studies it was found that the most damaging effect on the stability of erythrocyte membranes with respect to acids is the  $Cd(CH_3COO)_2 \times 2H_2O$  salt, since this sample reaches 100% hemolysis in 1.5 minutes, 6.5 minutes earlier than the control sample, which in turn indicates a low stability of the membranes under the influence of this chemical compound. Cadmium chloride has the least toxic effect, since the hemolysis process stops after 9.5 minutes, which is 1.5 minutes later than the control sample. Also, the oxides Co and Cd possess the smallest toxic effect on the stability of erythrocyte membranes to acids, which in our opinion is associated with a low level of dissociation of these compounds.

Keywords: erythrocyte, membrane resistance, cobalt, cadmium, acid resistance, hemolysis, acid erythrogram.

Биологические мембраны очень уязвимы к воздействию на них тяжелых металлов, в связи с этим на сегодняшний день актуальны исследования влияния ионов тяжелых металлов на живые объекты.

По данным литературных источников, загрязнение окружающей среды различными соединениями кобальта и кадмия происходит попаданием данных тяжелых металлов в атмосферу вместе с промышленной пылью, продуктами некоторых производств (стекляная, цементная и металлургическая промышленность, производства аккумуляторов, содержащих кадмий). Наибольшему риску воздействия данных металлов и их соединений подвержены работники вышеупомянутых производств. Наибольший процент тяжелых металлов попадает в организм человека через дыхательные пути, а также через ЖКТ, откуда вследствие абсорбции проникает в кровяное русло. Воздействие растворимых соединений кобальта приводит к повышению концентрации металла в крови и моче. Кадмий циркулирует в крови, главным образом в связанном состоянии в эритроцитах [1-3].

Механизм токсического действия кадмия заключается в том, что он связывает все серосодержащие аминокислоты и ферменты, при этом поражаются цитоплазма и ядра клеток. При интоксикации кадмием происходит поражение ЦНС, печени и почек, а также нарушается фосфорно-кальциевый обмен, что приводит к разрушению костей и развитию анемии.

Токсичность кобальта связывают с инактивацией тиоловых групп (например, липоевой кислоты) в тканях. Для человека наиболее высокой токсичностью обладают растворимые соли: карбонат кобальта, хлорид кобальта, а также металлический кобальт [4]. Избыток кобальта в организме проявляется в виде кровотечений, отека лёгких, нарушений работы щитовидной железы, повышения кровяного давления, ухудшения работы нервной системы и сердечной мышцы.

М.О. Трусевич в своих исследованиях доказал, все тяжелые металлы в концентрации свыше 0,008 мМ оказывают токсическое воздействие на устойчивость мембран эритроцитов [5].

Устойчивость эритроцитов к различным повреждающим действиям, характеризующаяся совокупностью физико-химических свойств клеток, во многом зависит от их состояния. Так, в норме мембрана клеток крови устойчива к окислительному стрессу. Это достигается как за счет структурной организации мембраны, так и за счет наличия в ней липофильных антиоксидантов. Установлено, что устойчивость эритроцитов к окислительному гемолизу является показателем индуцибельности перекисного окисления мембранных фосфолипидов [6].

Способность эритроцитов к гемолизу под действием гемолитических веществ используется в качестве критерия, определяющего стойкость клеток. При этом величиной для оценки стойкости служит время гемолиза. Время гемолиза эритроцитов находится в прямой зависимости от концентрации гемолитического агента. Неорганические кислоты в

ряду гемолитиков являются наиболее стабильными. Именно поэтому стойкость эритроцитов к кислотному гемолитику является важнейшим критерием, который связан с их физиологическим состоянием и возрастом, а также отражает состояние мембраны клетки. Известно, что гемолиз эритроцитов человека, вызываемый 0,002М раствором HCl, в норме протекает от 6 до 8 минут.

Цель исследования: изучение влияния солей кобальта и кадмия на кислотную устойчивость эритроцитов, а также сравнение оказываемых эффектов.

### **Материалы и методы исследования**

Суть методики исследования кислотной резистентности заключается в фотометрической регистрации кинетики лизиса эритроцитов под действием кислот, построении кислотных эритрограмм резистентности.

Принцип метода эритрограмм заключается в фотометрической регистрации кинетики лизиса эритроцитов под действием 0,002 или 0,001 н HCl при длине волны 670 нм [7].

В качестве реактивов нами использовался физиологический раствор NaCl 0,9%; соляная кислота (HCl) 0,001 и 0,002 н. Для проведения исследования использовали центрифугу и фотоэлектроколориметр.

В ходе исследования в одну из кювет вносили физиологический раствор, относительно которого и производились измерения во второй кювете, в которую помещали 1,5 мл 0,002 н раствор HCl и 0,7 мл 1% суспензии эритроцитов. Далее производились измерения оптической плотности на КФК при длине волны 670 нм взвеси эритроцитов с интервалом 10–30 секунд до тех пор, пока не будет зафиксировано окончание гемолиза. Затем выполнялись все необходимые расчеты по методу химических (кислотных) эритрограмм, описанному И.А. Терсковым, И.И. Гительзоном. В опытные образцы дополнительно были добавлены соли кобальта и кадмия с концентрацией 1 мМ [8].

Протекание гемолиза графически было изображено нами в виде временной зависимости, отражающей нарастающий процент гемолизированных эритроцитов. Построенная интегральная эритрограмма имела S-образный вид.

Достоверность полученных результатов оценивалась с помощью t-критерия Стьюдента.

### **Результаты исследования и их обсуждение**

В ходе исследования нами были получены значения, характеризующие изменения процента гемолиза с течением времени при воздействии солей кобальта и кадмия на мембраны эритроцитов.

Анализируя данные, мы установили, что в контрольном образце гемолиз достигает 100% через 8 минут. Увеличение каждого последующего значения происходит в небольшом диапазоне величин.

В образце, содержащем ацетат кобальта, наибольшее возрастание показателей происходит на 210-й и 360-й секунде в 5 раз и 76% соответственно. Уменьшение данных показателей отмечаются на 30; 60; 90; 150; 240; 330 и 390-й секунде на 7,5%; 15%; 9%; 9%; 13%; 8% и 9%. Полный гемолиз происходит через 7 минут, что на 1 минуту раньше, чем в контрольном образце.

При воздействии на эритроциты сульфата кобальта отмечается уменьшение процента гемолиза в сравнении с предыдущими показаниями на 120-й секунде на 16,4%. В остальных случаях наблюдается повышение значений, наибольшее из которых составляет 23% и происходит на 30-й секунде. Гемолитические процессы достигают максимума через 4 минуты после начала исследования, что на 4 минуты ранее, чем в контрольном образце.

В образце с оксидом кобальта наибольшее повышение процента гемолиза в сравнении с предыдущими показателями происходит на 20; 30; 60 и 90-й секундах на 48%; 52%; 66,7% и 29,5%. Наименьшее повышение этих значений происходят с 300-й по 450-ю секунду. Снижение на 1,7% зафиксировано на 420-й секунде. Процесс гемолиза останавливается через 8 минут, как и в контрольном образце.

При воздействии хлорида кобальта полный гемолиз происходит через 2 минуты, что на 5 минут ранее контрольного образца, это говорит о высокой токсичности данного соединения. На 20-й и 30-й секунде отмечается уменьшение показателей гемолиза в 2 и 4 раза соответственно. На протяжении всего оставшегося времени наблюдается увеличение процента гемолизированных клеток и наибольшее повышение зафиксировано на 60-й секунде и составляет 1,5 раза.

В образце с нитратом кобальта наблюдается равномерное постепенное увеличение процента гемолиза с течением времени и в целом составляет 4%. Процесс достижения полного гемолиза занимает 3,5 минуты, что на 4,5 минуты раньше, чем в контрольном образце.

Для визуализации данных нами был построен график, на котором отображен процент гемолизированных эритроцитов в зависимости от времени, прошедшего после добавления в образцы раствора HCl (рис. 1).

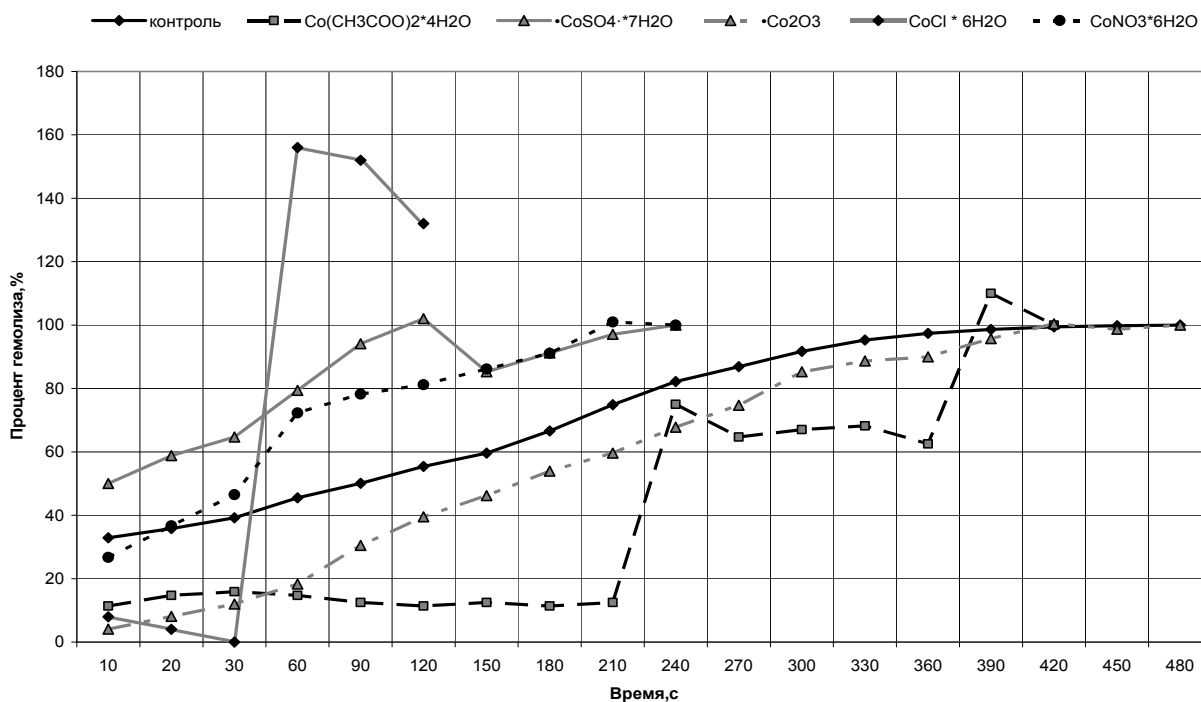


Рис. 1. Интегральная кислотная эритрограмма устойчивости эритроцитов в отношении солей кобальта

В результате исследований кислотной резистентности эритроцитов установлено, что наибольшие повреждения мембране наносят соли хлорида кобальта, так как полный гемолиз достигается на 6,5 минут раньше, чем в норме, что говорит о высоком повреждающем действии на устойчивость мембраны к воздействию кислот. Наименее токсичным оказалось соединение оксида кобальта, при воздействии данного соединения 100% гемолиз происходит через такой же промежуток времени, что и в контрольном образце.

В образце с ацетатом кадмия гемолитические процессы завершаются через 1,5 минуты, что на 6,5 минут быстрее, чем в норме. Наибольшее повышение показателей гемолиза в сравнении с предыдущими происходит главным образом на 30-й и 60-й секунде на 11% и 10% соответственно. В образце с сульфатом кадмия 100% гемолиз достигается через 5 минут, что на 3 минуты раньше контрольного. Наибольшее повышение показателей гемолиза зафиксировано на 20-й секунде на 33,5%, а наименьшее – на 180-й и 210-й секундах на 1,3%.

При воздействии на эритроциты оксидом кадмия гемолиз достигает максимальных значений через 8,5 минут, что на 0,5 минуты позднее, чем в контрольном образце. Наибольшее увеличение показателей гемолиза установлено в интервале от 20-й до 60-й секунды и в среднем составляет 40%. Наименьшее же увеличение зафиксировано во временном интервале с 360-й по 480-ю секунду.

В образце с хлоридом кадмия установлено, что 100% гемолиз достигается через 9,5 минут, что на 1,5 минуты позднее контрольного образца. Наибольшее повышение процента гемолиза в 1,3 раза установлено на 30-й секунде.

Для визуализации полученных данных нами был построен график оценки кислотной резистентности эритроцитов в отношении солей кадмия с учетом уровня диссоциации соединений (рис. 2).

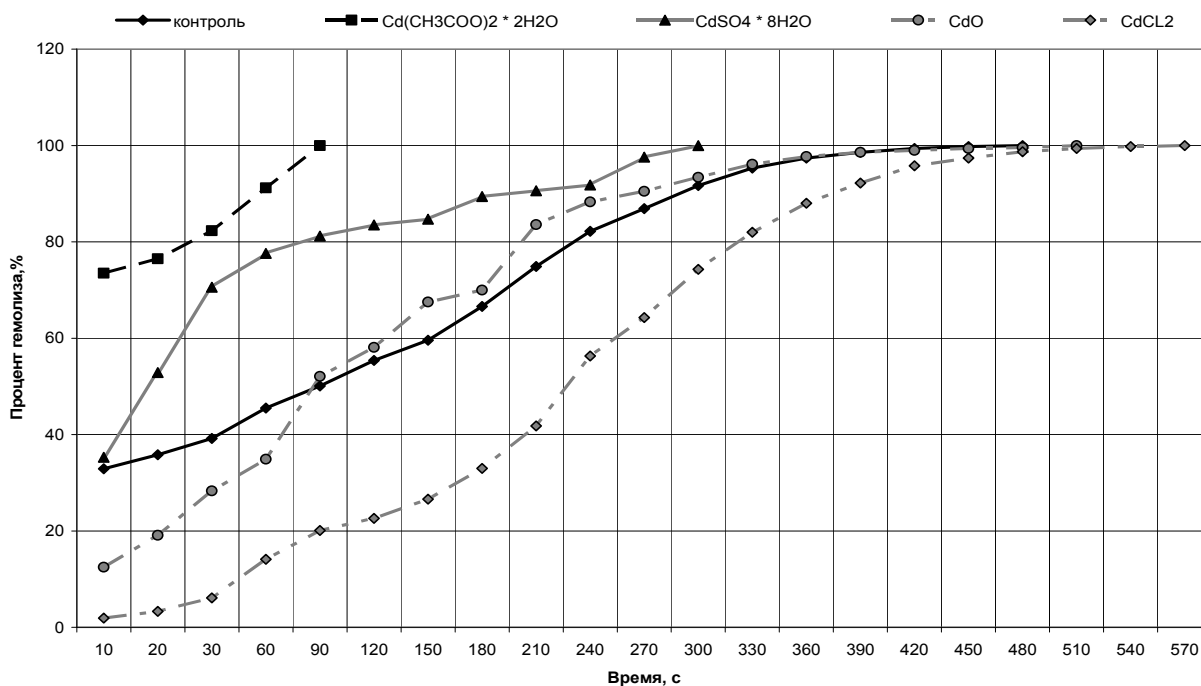


Рис. 2. Интегральная кислотная эритрограмма устойчивости эритроцитов в отношении солей кадмия

Анализируя данные, представленные на рисунке 2, установлено, что наибольшей токсичностью обладает ацетат кадмия, при воздействии которого 100% гемолиз происходит на 6,5 минут ранее, чем в контрольном образце. Наименьшим токсическим действием на кислотную устойчивость мембран эритроцитов характеризуются хлорид и оксид кадмия, так как полный гемолиз происходит позднее, чем в контрольном образце.

Для сравнения эффектов, оказываемых на мембрану солями Co и Cd, нами был построен график оценки кислотной устойчивости эритроцитарных мембран в отношении солей данных тяжелых металлов (рис. 3).

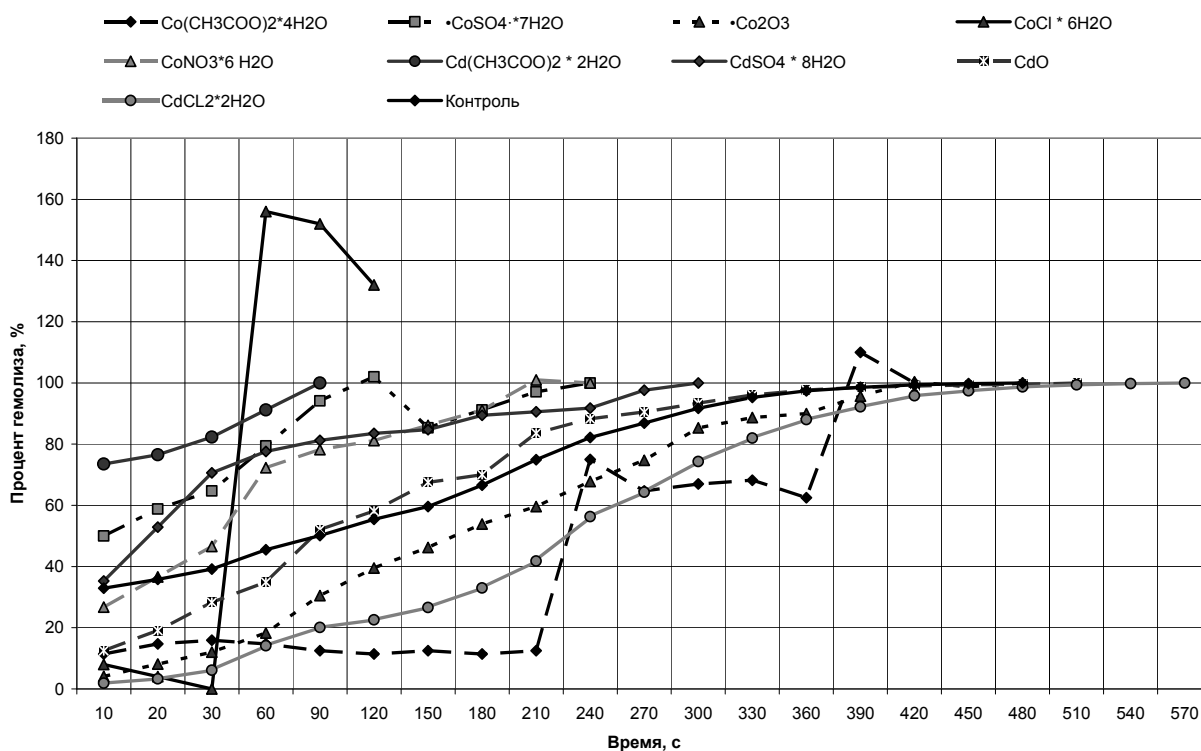


Рис. 3. Оценка кислотной резистентности эритроцитов в отношении солей кадмия и кобальта с учетом уровня диссоциации соединений. Интегральная эритрограмма

Анализируя данные рисунка 3, мы пришли к выводу, что наибольшим повреждающим эффектом на устойчивость мембран эритроцитов в отношении кислот обладает соль  $\text{Cd}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , поскольку данный образец достигает 100% гемолиза за 1,5 минуты, что на 6,5 минут ранее контрольного образца, и это говорит о низкой устойчивости мембран при воздействии ацетата кадмия.

### Заклучение

В ходе выполнения экспериментальных исследований по оценке влияния катионов кобальта и кадмия в составе солей с различными анионными компонентами нами было установлено, что наименьшим токсическим действием обладает хлорид кадмия, так как процесс гемолиза прекращается через 9,5 минут, что на 1,5 минуты позднее контрольного образца. Также наименьшим токсическим эффектом на устойчивость мембран эритроцитов к кислотам обладают оксиды кобальта и кадмия, что, на наш взгляд, связано с низким уровнем диссоциации данных соединений.

### Список литературы

1. Побилат А.Е., Волошин Е.И. Кадмий в почвах и растениях Средней Сибири // Микроэлементы в медицине. 2017. Т. 18, В. 3. С. 36-41.

2. Теплая Г.А. Тяжелые металлы как фактор загрязнения окружающей среды (обзор литературы) // Астраханский вестник экологического образования. 2013. № 1(23). С. 182-192.
3. Оберлис Д., Харланд Б., Скальный А. Биологическая роль макро- и микроэлементов у человека и животных. СПб.: Наука, 2008. 544 с.
4. Кочарли Н.К., Гумматова С.Т., Абдуллаев Х.Д., Зейналова Н.М. Влияние ионов тяжелых металлов на мембранную устойчивость эритроцитов в норме и при различной патологии организма // Фундаментальные исследования. 2012. № 11-2. С. 299-303.
5. Трусевич М.О. Изучение гемолиза эритроцитов под воздействием тяжелых металлов. Экология человека и проблемы окружающей среды в постчернобыльский период: материалы респуб. научн. конференции. Минск, 2009. С. 50.
6. Рабаданова А.И., Бамматмурзаева Д.М., Гасасаева Р.М. Кислотная и осмотическая устойчивость эритроцитов периферической крови человека при действии стрессовых факторов различного генеза // Современные проблемы науки и образования. 2013. № 6. URL: <https://www.science-education.ru/ru/article/view?id=11571> (дата обращения: 12.11.2018).
7. Бабаев Э.С. О механизме разрушения эритроцитов при наследственном сфероцитозе и подходах к устранению патологического процесса у детей // Гематол. и трансфузиол. 2001. Т. 43, вып. 1. С. 34-38.
8. Терсков И.А., Гительзон И.И. Метод химических (кислотных) эритрограмм // Биофизика. 1957. Т.2, №2. С.259-266.