

УДК 616.314-07:[615.9:661.852'071.2]-092.9

DOI: 10.15587/2519-4798.2017.100481

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ НАКОПЛЕНИЯ АЦЕТАТА СВИНЦА В ПЛАЗМЕ КРОВИ, МОЧЕ И ГОМОГЕНАТАХ ТВЕРДЫХ ТКАНЕЙ ЗУБОВ КРЫС

© В. Ф. Куцевляк, Н. П. Бобровская, К. Н. Беликов, Т. В. Шеина

Актуальным остается изучение токсического действия соединений свинца на твердые ткани зубов, поскольку свинец отнесен ВОЗ к глобальным загрязнителям окружающей среды. В исследовании методом атомно-абсорбционной спектроскопии проведен сравнительный анализ накопления ацетата свинца в плазме крови, моче и гомогенатах твердых тканей зубов контрольной группы крыс и в группе крыс получавших ацетат свинца в течении 1, 2 и 3 месяцев и выявлена наибольшая концентрация спустя три месяца
Ключевые слова: свинец, атомно-абсорбционный спектрометр, плазма крови, моча, гомогенат твердых тканей зубов

1. Введение

Воздействие тяжелых металлов, относящихся к глобальным загрязнителям окружающей среды, среди которых свинец ВОЗ включен в список приоритетных, является ведущим фактором в развитии большого числа болезней человека [1]. Многие заболевания, которые ранее диагностировались только как следствие воздействия профессиональных вредностей, теперь регистрируются и среди всего населения [2].

Мощными источниками загрязнения окружающей среды различными вредными веществами, в том числе металлами и их солями, являются предприятия цветной металлургии и их промышленные отходы [3].

Негативное воздействие на здоровье населения простирается от рабочего, соприкасающегося непосредственно со свинцом в производственном процессе, до всего населения, как через загрязнение окружающей среды, так и через потребительские товары, содержащие в своем составе свинец (кафель, керамика, хрусталь, краски и пр.) [4].

Известно, что структура заболеваемости в определенной мере зависит и от природных, в первую очередь климатических условий, а также от вида промышленности, качественного состава выбросов и их концентрации в воздушном пространстве (промышленные отходы, выхлопные газы от автотранспорта) [5]. Кроме того, в организм человека свинец в значительном количестве поступает с водой и продуктами питания [6].

2. Обоснование исследования

Большинство исследований посвящено клиническим аспектам токсического действия свинца на нервную [7], сердечно-сосудистую [8], иммунную системы [9], почки [10], печень [11], желудочно-кишечный тракт [12], репродукцию [13], онкологию [14]. Стоматологическое здоровье неразрывно связано с уровнем общего здоровья человека.

Длительное действие на организм вредных химических веществ, в частности свинца, даже в предельно допустимых концентрациях, проникно-

вание их во внутреннюю среду, приводит к нарушению адаптационных, барьерно-детоксикационных и выделительных систем. Однако роль свинца в развитии патологических процессов в полости рта и, в частности, твердых тканей зубов изучены недостаточно, хотя зубы являются удобным объектом для оценки уровня его накопления. Трудности возникают в связи с неравномерным распределением металла, зависимостью от типа зубов, возраста, профессии и других факторов [15]. Описаны случаи появления свинцовой каймы на деснах, отложение сернистого свинца на языке, мягком небе, слизистой оболочки губ и щек, развитие кариеса, пародонтита, а также изменения в костной ткани челюстей, артропатии [16].

На сегодняшний день нет углубленных исследований по вредному токсическому воздействию свинца на твердые ткани зубов, что и определяет необходимость дальнейшего изучения данного вопроса.

3. Цель исследования

Проведение сравнительного анализа количественного наличия ацетата свинца в плазме крови, моче и гомогенатах твердых тканей зубов крыс с целью изучения информативности показателей для оценки состояния аккумуляции и метаболизма ацетата свинца в зависимости от степени его накопления.

4. Материалы и методы исследования

Для изучения степени количественного накопления соединений свинца в гомогенатах твердых тканей зубов в эксперименте на крысах проведено комплексное исследование плазмы крови, мочи и гомогенатов твердых тканей зубов у 36 белых беспородных крыс-самцов массой тела 200–250 г. Условия содержания: групповое в помещении вивария Харьковской медицинской академии последипломного образования при температуре воздуха 25–27 °С (лето), влажности более 40 %, световом режиме день/ночь. Животных использовали в исследованиях после окончания карантина, то есть через 30 дней после поступления в виварий. Крыс взвешивали и осматривали перед началом проведения эксперимен-

та. Использовали животных одинакового возраста с интактными зубными рядами. Животные в течение эксперимента находились на стандартном водно-пищевом рационе вивария, со свободным доступом к воде и пище, дышали городским воздухом, поступающим из приточно-вытяжной вентиляции вивария.

В эксперименте использовали ацетат свинца производства «Макрохим» (Украина).

Животные были разделены на 2 группы: 1-я – контрольная (12 крыс), получавшая обычную воду на протяжении 1 месяца, до забора проб на исследование, 2-я (24 крысы) – опытная, животные получали ацетат свинца в дозе 10 мг/кг массы тела животного в виде 1 % раствора интрагастрально с питьевой водой ежедневно в течение 1, 2 и 3 месяцев. В опытной группе выделено три подгруппы по продолжительности затравки животных ацетатом свинца.

Исследования на животных проводили с соблюдением Международных принципов Европейской конвенции о защите позвоночных животных и в соответствии «Общих этических правил экспериментов над животными», утвержденных I Национальным конгрессом по биоэтике 20.10.2001 (г. Киев) и закона Украины «Про захист тварин від жорстокого поводження» № 3477- IV от 21.02.2006 г.

Забор мочи производили в течение дня с помощью эксикатора, собранная моча замораживалась. По окончании срока наблюдения производили эвтаназию животных под хлороформным рауш-наркозом. Из сердечной артерии брали кровь, её центрифугировали и замораживали. Затем из нижней челюсти вычленили гомогенат твердых тканей зубов, их отделяли от остатков костной ткани и затем фиксировали в 10 % растворе нейтрального формалина.

Измерения выполнялись на атомно-абсорбционном спектрометре iCE 3500 (Thermo Scientific, США). Спектрометр укомплектован двумя блоками атомизации – пламенным и электротермическим. Технические характеристики:

- диапазон длин волн – 180...900 нм;
- двухлучевая оптическая схема Стокдейла в пламенном варианте;
- однолучевая оптическая схема в электротермическом варианте;
- Эшелле монохроматор;
- коррекция фонового поглощения – Зеemanовская либо при помощи дейтериевой лампы, в отделе аналитической химии функциональных материалов и объектов окружающей среды (зав. отделом, канд. хим. наук Беликов К. Н.) Государственного научного учреждения «Научно-технологический комплекс «Институт монокристаллов» НАН Украины.

Определение количественного содержания ацетата свинца в образцах плазмы крови крыс измеряли в электротермическом варианте атомно-абсорбционной спектрометрии с предварительным разложением плазмы крови при помощи микроволновой установки MDS-2000 (CEM Corporation, США). Встроенный компьютер позволял программировать

пятистадийный процесс обработки проб, каждая стадия которого не превышала 60 минут при максимальных значениях давления и температуры. Способ градуировки – метод стандартных добавок. Анализируемые растворы, добавки раствора с известным содержанием свинца и раствор химического модификатора дозировались в графитовую кювету при помощи автосамплера. Регистрация сигналов, построение градуировочного графика и расчет концентрации ацетата свинца в анализируемых растворах осуществляли программным обеспечением спектрометра.

Образцы мочи крыс (0,5 мл) помещали в стеклянные химические стаканы объемом 50 мл, прибавляли по 2,5 мл концентрированной HNO_3 (65 %) и по 2,5 мл деионизированной воды. Растворы нагревали на электроплитке до кипения и выдерживали в течение 5 мин. Полученные растворы охлаждали до комнатной температуры, количественно переносили в мерные колбы объемом 10 мл и доводили до метки деионизированной водой. Выполняли измерения количественного содержания ацетата свинца в электротермическом варианте атомно-абсорбционной спектрометрии с регистрацией сигналов, построением градуировочного графика и расчетом концентрации ацетата свинца, которое осуществлялось программным обеспечением спектрометра.

Для определения количественного содержания ацетата свинца в гомогенатах твердых тканей зубов крыс изготавливали навески зубов массой 0,04–0,25 мг, помещали их в стеклянные химические стаканы объемом 50 мл, добавляли по 3 мл концентрированной HNO_3 (65 %) и по 2 мл деионизированной воды, нагревали до полного растворения образцов, не допуская сильного вскипания и разбрызгивания растворов, охлаждали до комнатной температуры и количественно переносили в мерные колбы объемом 10 мл, доводили до метки деионизированной водой и перемешивали. Градуировку выполняли по методу градуировочного графика. Для чего готовили градуированные растворы, содержащие азотную кислоту в количестве, эквивалентном пробам и добавки стандартного раствора свинца. Концентрация свинца в градуированных растворах (мг/л): 0,1; 0,2; 0,4 и 0,6. Для приготовления использовали стандартный раствор свинца с концентрацией 1 мг/мл. Измерения производили в пламени ацетилен-воздух при длине волны 217,0 нм. Регистрация сигналов, построение градуировочного графика и расчет концентрации свинца в анализируемых растворах осуществлялись программным обеспечением спектрометра.

Полученные количественные показатели наличия ацетата свинца в плазме крови, моче и гомогенатах твердых тканей зубов обрабатывали статистически с помощью программы STATISTICA 6.1 для оценки погрешности и достоверности полученных результатов. Для определения степени отличий тех или иных выборок был использован t-критерий Стьюдента.

5. Результаты исследования

В плазме крови контрольной группы крыс методом электротермического атомно-абсорбционного анализа определено незначительное количество ацетата свинца ($0,055 \pm 0,003$ мкг/мл) табл. 1.

Таблица 1
Количественные показатели атомно-абсорбционного анализа содержания ацетата свинца в плазме крови, моче и гомогенатах твердых тканей зубов крыс

Группа животных	Кол-во	Материал исследования		
		Плазма крови мкг/мл	Моча мкг/мл	Гомогенат твердых тканей зубов мкг/г
Контроль	12	$0,055 \pm 0,003$	$0,062 \pm 0,001$	$11,7 \pm 0,4$
1 месяц	8	$0,086 \pm 0,002$ $p < 0,05$	$0,165 \pm 0,005$ $p < 0,05$	$18,4 \pm 0,5$ $p < 0,05$
2 месяц	8	$0,12 \pm 0,006$ $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$	$0,173 \pm 0,002$ $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$	$18,9 \pm 0,1$ $p_1 < 0,05$
3 месяц	8	$0,18 \pm 0,02$ $p_3 < 0,05$ $p_4 < 0,05$	$0,175 \pm 0,003$ $p_3 < 0,05$	$19,4 \pm 0,6$ $p_3 < 0,05$

Примечание: p – достоверность отличий между показателями контроля и 1-го месяца; p_1 – достоверность отличий между показателями контроля и 2-го месяца; p_2 – достоверность отличий между показателями 1-го и 2-го месяца; p_3 – достоверность отличий между показателями контроля и 3-го месяца; p_4 – достоверность отличий между показателями 2-го и 3-го месяца

Свинец, как микроэлемент содержится в плазме крови и нельзя исключать его поступление в организм крысы с пищей, водой, а также из атмосферного воздуха окружающей среды. Рядом с виварием, где находились крысы, проходит улица с постоянным движением машин, что не исключает воздействие на крыс выхлопных газов автотранспорта.

В моче контрольной группы крыс также, как и в крови определено небольшое количество ацетата свинца ($0,062 \pm 0,001$), оно несколько выше, чем в крови, но это различие недостоверно ($p > 0,05$). Моча является одним из путей выведения тяжелых металлов из организма, этим и объясняется большее количество выведение ацетата свинца у крыс.

В гомогенатах твердых тканей зубов крыс контрольной группы обнаружен ацетат свинца в количестве $11,7 \pm 0,4$ мкг/г, что достоверно многократно больше, чем в плазме крови и моче, что объясняется кумуляцией металла в зубах и медленным его выведением.

Через месяц затравки крыс ацетатом свинца в плазме крови опытной группы установлено $0,086 \pm 0,002$ мкг/мл металла, что достоверно выше его содержания по сравнению с контролем ($p < 0,05$). В моче крыс было существенное повышение содержания

ацетата свинца по сравнению с контролем ($p < 0,05$). В гомогенатах твердых тканей зубов количество ацетата свинца составило $18,4 \pm 0,5$ мкг/г, что достоверно выше, чем в контрольной группе ($p < 0,05$). Ацетат свинца в крови является решающим показателем его воздействия на организм, а выведение его с мочой в течение 3 месяцев проведено с целью подтверждения хронической свинцовой интоксикации. В гомогенатах твердых тканей зубов с целью определения величины аккумуляции.

Спустя 2 месяца затравки крыс ацетатом свинца выявлено достоверное повышение его содержания в плазме крови ($0,12 \pm 0,006$) по сравнению с контролем ($p < 0,05$) и с первым месяцем затравки ($p < 0,05$). В моче крыс также определено значительное достоверное повышение его содержания ($0,173 \pm 0,002$) по сравнению с контролем и с первым месяцем затравки ($p < 0,05$). В гомогенатах твердых тканей зубов крыс выявлено достоверное повышение ацетата свинца ($18,9 \pm 0,1$) по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

Через 3 месяца затравки крыс ацетатом свинца в плазме крови установлено достоверное увеличение его содержания ($0,18 \pm 0,02$) по сравнению с контролем ($p < 0,05$), а также со вторым месяцем ($p < 0,05$). В моче крыс также выявлено достоверное увеличение содержания ацетата свинца ($0,175 \pm 0,003$) по сравнению с контролем. В гомогенатах твердых тканей зубов крыс через 3 месяца выявлено достоверное увеличение его содержания ($19,4 \pm 0,6$ мкг/г) по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

6. Обсуждение результатов исследования

В результате проведенного исследования можно утверждать, что опасный токсикант – свинец даже с хронической низкодозовой нагрузкой присутствует в организме животного, что подтверждается показателями анализа крови и мочи. Несмотря, на низкодозовое внешнее введение ацетата в виде 1 % водного раствора в дозе 10 мг/кг массы тела животного в крови, моче и гомогенатах твердых тканей зубов крыс его концентрация была выше показателей контрольной группы начиная с 1-го месяца затравки и достигало наибольших величин к концу 3-го месяца.

Изучение токсического действия соединений свинца на твердые ткани зубов является актуальным и важным, поскольку свинец отнесен ВОЗ к глобальных загрязнителям окружающей среды (тяжелым экотоксикантам) и проблема влияния его на здоровье человека, в частности, на органы полости рта приобрела всемирное значение.

Для выявления видимых структурных изменений в гомогенатах твердых тканях зубов в результате действия на них ацетата свинца необходимо проведение морфологических исследований.

Для успешного решения проблем патологии твердых тканей зубов, связанных с негативным воздействием тяжелых металлов, и в частности, свинца необходимы дальнейшие систематические исследования не только экспериментальные, но и клинические.

7. Выводы

1. На основании полученных сравнительных данных количественного накопления ацетата свинца в плазме крови, моче и гомогенатах твердых тканей зубов крыс методом атомно-абсорбционного анализа установлено, что в контрольной группе крыс уже было наличие ацетата свинца в результате содержания его как микроэлемента, и поступления в организм с пищей, водой и из атмосферного воздуха окружающей среды.

2. В проведенном исследовании определено накопление малых доз ацетата свинца в плазме крови, моче и гомогенатах твердых тканей зубов по мере увеличения срока затравки крыс.

3. Полученные данные свидетельствуют о наибольшем количественном содержании ацетата свинца в гомогенатах твердых тканей зубов крыс в сроки спустя 3 месяца затравки, что свидетельствует о его кумуляции.

Литература

1. Tchounwou, P. B. Heavy Metal Toxicity and the Environment [Text] / P. B. Tchounwou, C. G. Yedjou, A. K. Patlolla, D. J. Sutton // *Experientia Supplementum*. – 2012. – P. 133–164. doi: 10.1007/978-3-7643-8340-4_6
2. Трахтенберг, I. М. Свинець – небезпечний полютант. Проблема стара і нова [Текст] / I. М. Трахтенберг, Н. М. Дмитруха, С. П. Луговський, I. С. Чекман // *Сучасні проблеми токсикології, хорчової та хімічної безпеки*. – 2015. – № 3. – С. 14–24.
3. Kianoush, S. Clinical toxicological, biochemical and hematologic parameters in lead exposed workers of a car battery industry [Text] / S. Kianoush, M. Balati-Mood, S. R. Mousavi et. al. // *Iran J. Med. Sci.* – 2013. – Vol. 38, Issue 1. – P. 30–37.
4. Вертелецкая, М. И. Структура, клинические особенности соматической патологии у рабочих свинцового производства [Текст] / М. И. Вертелецкая, К. А. Семенова, Л. П. Авраменко, Т. В. Болотнова // *Академический журнал Западной Сибири*. – 2015. – № 1 (56). – С. 10–11.
5. Кротенко, И. С. Влияние на здоровье населения выбросов вредных веществ автотранспорта [Текст]: науч.-практ. конф. / И. С. Кротенко, Л. Н. Мовчан, В. Е. Альшевская, Н. Л. Зверева // *Екологія Харківщини: стан, проблеми, перспективи*. – 2011. – С. 126.
6. Єрем, Т. В. Характеристика вмісту деяких важких металів у продуктах харчування, що становлять раціон мешканців Закарпатської області [Текст] / Т. В. Єрем // *Довкілля та здоров'я*. – 2015. – № 4. – С. 23–25.
7. Mason, L. H. Pb Neurotoxicity: Neuropsychological Effects of Lead Toxicity [Text] / L. H. Mason, J. P. Harp, D. Y. Han // *BioMed Research International*. – 2014. – Vol. 2014. – P. 1–8. doi: 10.1155/2014/840547
8. Сушанло, Р. Ш. Влияние свинцовой интоксикации и гипоксии на сердечно-сосудистую систему (литературный обзор) [Текст] / Р. Ш. Сушанло // *Сибирский мед. ж.* – 2016. – Т. 31, № 3. – С. 33–38.
9. Mishra, K. P. Lead exposure and its impact on immune system: A review [Text] / K. P. Mishra // *Toxicology in Vitro*. – 2009. – Vol. 23, Issue 6. – P. 969–972. doi: 10.1016/j.tiv.2009.06.014
10. Вепрюк, Ю. М. Возрастные особенности ионорегулирующей функции почек при воздействии солями алюминия и свинца в условиях гипофункции шишковидной железы [Текст] / Ю. М. Вепрюк // *Здоровье и образование в XXI веке*. – 2013. – Т. 15, № 1-4. – С. 243–246.
11. Довгаль, Г. В. Морфологічні зміни в розвитку печінки щурів при впливі ацетату свинцю та за умов корекції в пренатальному періоді [Текст] / Г. В. Довгаль // *Український морфологічний альманах*. – 2014. – № 12 (1). – С. 42–44.
12. Луговской, С. П. Механизмы биологического действия свинца на пищеварительную систему [Текст] / С. П. Луговской, Л. А. Легкоступ // *Сучасні проблеми токсикології*. – 2002. – № 2. – С. 45–50.
13. Романюк, А. М. Морфологічні зміни у статевих органах (сім'яники, передміхурова залоза) в умовах впливу на організм солей важких металів [Текст] / А. М. Романюк, С. В. Сауляк, Ю. В. Москаленко, О. К. Романюк, А. О. Шкрюба // *Таврический медико-биологический вестник*. – 2013. – Т. 16, № 1 (61). – С. 210–211.
14. Ильичева, С. А. Изучение канцерогенности свинца в когортном исследовании мужчин-работников типографии Москвы [Текст] / С. А. Ильичева, Д. Г. Заридзе // *Гигиена и санитария*. – 2015. – № 5. – С. 75–77.
15. Куцевляк, В. Ф. Інтенсивність карієсу зубів серед населення, що проживає в умовах підвищеного впливу солей важких металів [Текст] / В. Ф. Куцевляк, Ю. В. Лахтін // *Новини стоматології*. – 2011. – № 3. – С. 58–60.
16. Лахтин, Ю. В. Влияние солей тяжелых металлов на возникновение основных стоматологических заболеваний [Текст]: монография / Ю. В. Лахтин, Л. И. Григорьева, В. А. Полосухин, О. А. Зорина и др. – К.: Экология и здоровье населения, 2012. – С. 149–180.

Дата надходження рукопису 14.03.2017

Валентина Федоровна Куцевляк, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой, кафедра стоматологии и терапевтической стоматологии, Харьковская медицинская академия последипломного образования, ул. Амосова, 58, г. Харьков, Украина, 61176

Наталья Павловна Бобровская, аспирант, кафедра стоматологии и терапевтической стоматологии, Харьковская медицинская академия последипломного образования, ул. Амосова, 58, г. Харьков, Украина, 61176
E-mail: natusyia@mail.ru

Константин Николаевич Беликов, кандидат химических наук, заведующий отделом, отдел аналитической химии им. А. Б. Бланка, Государственное научное учреждение «Научно-технологический комплекс «Институт монокристаллов» НАН Украины, пр. Науки, 60, г. Харьков, Украина, 61000

Татьяна Владимировна Шеина, кандидат химических наук, научный сотрудник, отдел аналитической химии им. А. Б. Бланка, Государственное научное учреждение «Научно-технологический комплекс «Институт монокристаллов» НАН Украины, пр. Науки, 60, г. Харьков, Украина, 61000