УДК: 616.61-06:546.4/.5]:612.017.2

В.П.Пішак, Т.М.Бойчук

ХРОНОРИТМИ ГЕМОКОАГУЛЯЦІЇ І ФУНКЦІЇ НИРОК ПРИ ІНТОКСИКАЦІЇ ВАЖКИМИ МЕТАЛАМИ

Кафедра медичної біології, генетики та паразитології (зав. - проф. В.П.Пішак) Буковинської державної медичної академії

Ключові слова: хроноритм, важкі метали, гемокоагуляція, нирки

Резюме. В експериментах на нелінійних самцях білих щурів досліджено 30-добовий вплив хлоридів талію і свинцю в дозі 0,5 мг/кг та кадмію хлориду в дозі 0,05 мг/кг на хроноритми екскреторної, кислотовидільної, іонрегулюючої функцій нирок та системи гемостазу.

Встановлено, що в досліджуваних дозах кадмій та свинець, порівняно із талієм, викликають більш виражену дизритмію процесів ниркового транспорту натрію з ознаками ушкодження проксимального відділу нефрона. Зниження середньодобових рівнів діурезу та клубочкової фільтрації, високі мезори екскреції кислих валентностей вказували на порушення екскреторної та кислотовидільної функцій нирок при інтоксикації кадмієм та свинцем.

Талій пошкоджував переважно дистальний відділ нефрона. Перебудова хроноритмів екскреторної та кислотовидільної функцій нирок мала компенсаторний характер.

Малі дози важких металів активують первинний та вторинний гемостаз, особливо в вечірній період доби. Синфазно зростала фібринолітична активність крові. Вночі коагуляційний потенціал знижувався. Автори пов'язують гіперкоагуляцію із ендотеліотоксичною дією важких металів. Зроблено висновок, що ввечері судинна стінка має мінімальну резистентність до їх токсичної дії.

Вступ. Важкі метали належать до основної групи забруднювачів біосфери і створюють значний ризик для здоров'я людей [7-9, 13, 16, 17]. Тому актуальним завданням залишається пошук надійних критеріїв ранньої діагностики патогенного впливу цих речовин на організм, маркерами якого можуть бути хроноритми фізіологічних процесів.

Відомо, що високі дози важких металів пошкоджують нирки, але нефротоксичність малих доз талію, кадмію і свинцю вивчена недостатньо. Водночас нирки відіграють важливу роль в регуляції агрегатного стану крові. Між цими системами існує тісний взаємозв'язок. Порушення реологічних властивостей крові віддзеркалюється на гемодинаміці мікроциркуляторного русла нирок, а пошкодження різних відділів нефрона та тканини нирок призводить до дисбалансу в крові прокоагулянтів, антикоагулянтів та активаторів фібринолізу, що змінює коагуляційний потенціал [1, 3]. Саморегуляція цих систем відбувається шляхом циркадіанних коливань активності їх окремих компонентів.

Метою роботи було вивчити хроноритми функції нирок та системи гемостазу за умови хронічної дії малих доз хлоридів кадмію, талію і свинцю.

Матеріал і методи. Експерименти проводили на статевозрілих самцях білих щурів, масою 0,15-0,18 кг., яким 30 діб внутрішньошлунково вводили кадмію хлорид в дозі 0,05 мг/кг, талію та свинцю хлорид в дозах 0,5 мг/кг, а також комбінацію металів в тих же дозах. Контрольній групі тварин вводили водогінну воду. Біоритми функції нирок досліджували в кінці експерименту з 4-годинним інтервалом за умови водного навантаження. Паралельно вивчали біоритми показників загального гемокоагуляційного потенціалу крові, показників внутрішньосудинної гемокоагуляції, судинно-тромбоцитарного гемостазу та фібринолітичної системи крові. Визначення проводили за стандартними методиками [5, 6]. Результати статистично обробляли методом "Косинор-аналізу" та параметричними методами статистики на ПЕВМ.

Результати дослідження та їх обговорення. Кадмій знижував середньодобовий рівень діурезу з мінімальними значеннями показника вночі. Талій та свинець перебудовували фазову структуру ритмів в межах стабільних мезорів (табл.1) з високою амплітудою.

Важкі метали, за виключенням талію, гальмували швидкість клубочкової фільтрації, в періоди якої спостерігали гіперазотемію, але мезор концентрації креатиніну в плазмі вірогідно зростав тільки при мікросатурнізмі (табл.1). Талій, навпаки, вдвічі збільшував рівень ультрафільтрації, особливо вдень та ввечері з акрофазою о 20.00 год. За цих умов компенсаторно зростала реабсорбція води та концентраційний індекс ендогенного креатиніну.

Деструктивні зміни гломерулярного фільтру при кадмієвій нефропатії відзеркалювалися підвищеною екскрецією білка. Талій знижував мезор показника, а за свинцевої інтоксикації він залишався стабільним. В усіх випадках зростала амплітуда ритмів та змінювалася фазова структура.

Виражений десинхроноз іонорегулюючої функції вказував на пошкодження важкими металами ниркових транспортних систем. В першу чергу це проявлялося підвищеною екскрецією натрію (табл.1). Кадмій в 10 разів збільшував середньодобовий рівень показника, а свинець - в 3 рази. Характерно, що високу екскрецію катіону спостерігали за низького фільтраційного заряду, але й за таких умов, його абсолютна та відносна реабсорбція залишалися зниженими. За кадмієвої інтоксикації гальмувався проксимальний транспорт натрію, особливо вночі та вранці, що цілком закономірно призводило до збільшення фільтраційного навантаження на дистальні відділи нефронів і підвищувало рівень натрію в області macula densa. Збудження хеморецепторів щільної плями, потенціювало секрецію реніну з наступною активацією тубуло-гломерулярного зворотнього зв'язку і внутрішньонирковою генерацією ангіотензину II. Це забезпечувало компенсаторне зменшення фільтраційної фракції з розвитком тонічної констрикції приносних артеріол нирок і вторинним пошкодженням ниркових структур внаслідок ішемічної активації пероксидного окиснення ліпідів. Ймовірний за таких умов абсолютний чи відносний дефіцит кисню перешкоджав процесам ресинтезу АТФ.

Таблиця 1

Середньодобові рівні (M±m) показників функції нирок за умови хронічної інтоксикації малими дозами важких металів

Показники	Контроль n=49	Кадмію хлорид n=49	Талію хлорид n=49	Свинцю хлорид n=49
Діурез, мл/2год	4,19±0,11	3,38±0,27 **p<0,01**	3,68±0,29	3,86±0,17
Концентрація креатиніну в плазмі, мкмоль/2год	55,49±2,74	69,81±9,45	51,16±6,24	92,33±7,31 **p<0,001**
Клубочкова фільтрація, мкл/хв	568,60±29,75	420,96±46,40 **p<0,05**	1222,53±323,41 **p<0,001**	333,26±38,41 **p<0,01**
Відносна реабсорбція води, %	93,21±0,36	92,15±1,37	96,70±0,42 **p<0,001**	89,62±1,99 **p<0,05**
Екскреція білка, мг/ 100 мкл клубочкового фільтрату	0,064±0,005	0,088±0,011 **p<0,05**	0,024±0,006 **p<0,001**	0,079±0,015
Екскреція натрію, мкмоль/100 мкл клубочкового фільтрату	0,45±0,07	4,41±1,16 **p<0,01**	0,62±0,13	1,33±0,15 **p<0,001**
Фільтраційна фракція натрію, мкмоль/хв	73,92±3,76	52,65±5,12 **p<0,01**	173,32±34,56 **p<0,01**	45,56±7,32 **p<0,01**
Відносна реабсорбція натрію, %	99,97±0,01	99,70±0,10 **p<0,05**	99,95±0,02	99,92±0,01 **p<0,01**
Проксимальний транспорт натрію, мкмоль/100 мкл клубочкового фільтрату	12,09±0,10	11,62±0,15 **p<0,05**	13,62±0,29 **p<0,001**	12,30±0,28
Дистальний транспорт натрію, мкмоль/ 100 мкл клубочкового фільтрату	0,88±0,05	0,97±0,20	0,46±0,05 **p<0,001**	1,54±0,18 **p<0,01**
pH сечі, од.	6,67±0,07	6,56±0,06	6,63±0,12	6,97±0,08 **p<0,01**
Екскреція кислот, що титруються, мкмоль/100 мкл клубочкового фільтрату	6,59±0,65	24,66±6,42 **p<0,01**	10,71±2,72	30,57±9,58 **p<0,05**
Екскреція аміаку, мкмоль/100 мкл клубочкового фільтрату	13,59±1,08	61,30±17,18 **p<0,01**	14,54±2,17	65,95±13,56 **p<0,01**

n - кількість спостережень; p - ступінь достовірності змін досліджуваних показників між дослідною та контрольною групами

Високий рівень проксимального транспорту натрію при талотоксикозі мав адаптивну направленість, запобігаючи втратам натрію при високій клубочковій фільтрації. Дистальна реабсорбція гальмувалася, очевидно внаслідок блокади натрій/калієвої АТФ-ази.

Свинець не змінював проксимальної реабсорбції натрію, але вдвічі збільшував дистальний транспорт (табл.1), проте рівень екскреції залишався високим.

Десинхроноз кислотовидільної функції нирок відзеркалювався високою екскрецією титрованих кислот та аміаку. Максимальні зміни реєстрували за свинцевої інтоксикації, менші - при кадмієвій нефропатії, а при талотоксикозі мезори залишалися стабільними на тлі високих амплітуд (табл.1). Свинець пригнічував екскрецію активних іонів водню, тому кислотність сечі зміщалася в лужний бік.

При комбінованій дії важких металів максимально знижувалася клубочкова фільтрація з наростаючими ознаками гіперазотемії і протеїнурії, порушувалася концентраційна функція. Збільшувалася екскреція натрію з акрофазою о 24.00 год., коли рівень показника зростав в 16 разів, не зважаючи на активацію в цей період проксимальної та дистальної реабсорбції, але був нижчим ніж при інтоксикації кадмієм. Рівень екскреції титрованих кислот та аміака також був нижчим, ніж при кадмієвій та свинцевій нефропатіях.

Враховуючи, що в патогенезі токсичних нефропатій важливе значення має порушення реологічних властивостей крові, паралельно ми досліджували хроноритми гемостазу та фібринолізу.

Важкі метали різко активували первинний гемостаз з високими середньодобовими рівнями адгезивної та агрегаційної активності тромбоцитів. Двофазна структура ритмів відображала реакцію звільнення і секрецію тромбоцитами речовин, що обумовлюють другу хвилю агрегації і зворотньо корелювала з фільтраційною функцією нирок.

Синфазно з первинним активувався коагуляційний гемостаз. Кадмій збільшував середньодобовий рівень часу рекальцифікації (табл.2). Зміщення акрофази ритму з 20.00 год. на 8.00 год. призвело до гіпокоагулянтного стану вночі та вранці високим коагуляційним потенціалом з 16.00 по 20.00 год. Талій і свинець також змінювали фазову структуру ритмів, але в межах стабільного середньодобового рівня. Зберігався паралелізм циркадіанних ритмів внутрішнього та зовнішнього шляхів зсідання крові: батифази активованого парціального тромбопластинового та протромбінового часу припадали на період з 16.00 по 20.00 год., а зниження зсідаючої активності крові спостерігали вночі. Середньодобові рівні показників не змінювалися, а їх амплітуда різко зменшувалася, що відзеркалювало виснаження ферментативних систем гемокоагуляції.

Хроноструктура фібриногенезу за тромбіновим часом відповідала змінам загального гемокоагуляційного потенціалу. Мініфази утворення фібрину співпадали з високими концентраціями продуктів деградації фібрину, які можуть пригнічувати останню фазу зсідання крові. Кадмій і свинець знижували концентрацію фібриногену в крові (табл.2).

В періоди гіперкоагуляції прискорювалися процеси полімеризації фібрину-s в фібрин-і, на що вказувала синфазна активація фактора Лакі-Лорана. Кадмій і свинець пригнічували мезор активності XIII фактору, а при талотоксикозі цей показник залишався стабільним (табл.2). Суттєво гальмувалася амплітуда ритмів.

Таблиця 2

Середньодобові рівні (M±m) показників системи регуляції агрегатного стану крові за умови хронічної інтоксикації малими дозами важких металів

Показники		Контроль n=49	Кадмію хлорид n=49	Талію хлорид n=49	Свинцю хлорид n=49
Загальний гемокоагуляційний потенціал крові					
Час рекальцифікації, сек		47,77±8,71	84,31±12,19 **p<0,05**	65,77±8,34	62,82±4,38
Протромбіновий час, сек.		28,64±9,89	23,69±1,06	23,58±2,17	19,90±1,68
Тромбіновий час, сек.		15,66±3,93	20,62±2,48	14,89±1,39	14,34±1,37
Активований парціальний тромбопластиновий час, сек		28,79±6,58	30,93±1,62	34,72±1,95	29,02±2,53
Фібриноген, г/л		3,58±0,16	2,98±0,13 **p<0,01**	3,23±0,19	3,04±0,11 **p<0,01**
Параметри внутрішньосудинної гемокоагуляції					
Активність XIII фактору, %		113,04±16,08	76,99±3,94 **p<0,05**	87,55±3,92	82,01±1,58 **p<0,05**
Продукти деградації фібрину, мкл/мл		0,0	0,37±0,15 **p<0,05**	3,10±1,08 **p<0,01**	0,47±0,16 **p<0,01**
Розчинні комплекси фібрин-мономеру, мкл/мл		0,51±0,14	1,37±0,38 **p<0,05**	4,69±1,33 **p<0,01**	1,34±0,60
Фібринолітична система крові					
Сумарна фібринолітична активність, $E_{440/мл/год}$		0,36±0,08	3,58±0,28 **p<0,001**	3,91±1,33 **p<0,05**	2,49±0,14 **p<0,001**
Неферментативна фібринолітична активність, $E_{440/мл/год}$		0,044±0,007	1,32±0,22 **p<0,001**	1,57±0,54 **p<0,01**	1,14±0,08 **p<0,001**
Ферментативна фібринолітична активність, $E_{440/мл/год}$		0,43±0,11	2,43±0,14 **p<0,001**	2,34±0,81 **p<0,05**	1,36±0,10 **p<0,001**
Потенційна активність плазміногену, хв.		35,31±8,42	20,59±1,35	24,27±1,94	17,90±1,24
Хагеман-залежний фібриноліз, хв.		38,86±9,44	20,53±1,50	23,37±1,79	17,88±1,24 **p<0,05**
Антиплазміни, %		93,71±2,91	123,47±6,20 **p<0,001**	115,07±4,66 **p<0,01**	114,75±3,65 **p<0,001**
Протеоліз крові	азоальб. $E_{440/мл/год}$	2,01±0,18	4,47±0,69 **p<0,001**	1,03±0,17 **p<0,001**	8,38±1,24 **p<0,001**
	азоказ. $E_{440/мл/год}$	1,67±0,23	7,40±1,77 **p<0,01**	2,16±0,44	7,00±0,98 **p<0,001**
	азокол. $E_{440/мл/год}$	0,25±0,03	0,71±0,04 **p<0,001**	0,36±0,12	0,87±0,27 **p<0,05**

Примітка. n - кількість спостережень; p - ступінь достовірності змін досліджуваних показників між дослідною та контрольною групами

Компенсаторну активацію фібринолітичної системи характеризували високі концентрації продуктів деградації фібрину. Зростала як ферментативна, так і неферментативна фібринолітична активність плазми, але переважав ферментативний лізис фібрину (табл.2).

В кірковій речовині нирок домінував ферментативний фібриноліз і необмежений протеоліз високомолекулярних білків. Це вторинно підтверджувало процеси мікротромбоутворення в капілярних клубочках нефронів. Градієнт фібринолітичного потенціалу наростав в напрямку ниркового сосочка. На відміну від кадмію та талію, свинець різко гальмував фібринолітичну активність у всіх зонах нирок, але мезор урокіназної активності сечі не змінювався.

При комбінованому впливі важких металів наставав зрив компенсаторних можливостей системи регуляції агрегатного стану крові. Формувалася картина хронічного ДВЗ-синдрому з розвитком коагулопатії споживання. На це вказували високі концентрації продуктів паракоауляції та ареактивність процесів гемостазу та фібринолізу з монотонним перебігом ритмів.

Ми вважаємо, що в основі механізму активації важкими металами як первинного так і вторинного гемостазу є пошкодження структури біологічних мембран ендотелію і клітин крові та виходом активаторів зсідання крові. Ендотеліоцити синтезують простациклін та фермент апіразу, що перешкоджають тромбоагрегації [4]. Інтактність ендотеліального пласту забезпечує також пристінковий шар глікопротеїнових глікозаміногліканів, які мають однаковий заряд з клітинами крові. Відомо, що важкі метали є мембранотоксичними агентами, які можуть пошкоджувати ендотеліальний шар [11, 12], звільняючи колагенові волокна, за рахунок чого й зростала адгезивна активність тромбоцитів. Порушення рівноваги між простацикліном та індуктором агрегації тромбоксаном A_2, призводило до високого середньодобового рівня тромбоагрегації. Окрім тригерного, простагландинового механізму, в активації первинного гемостазу, на нашу думку, важливе значення має посилення пероксидного окиснення ліпідів [10, 14] з утворенням гідропероксидів поліненасичених жирних кислот, що стимулюють тромбоагрегацію.

Колагенові волокна субендотеліального шару можуть активувати фактор Хагемана і запускати за внутрішнім шляхом коагуляційний гемостаз [1]. Водночас, при пошкодженні ендотелію в кров виділяється зовнішній активатор зсідання крові - тканевий тромбопластин, а внаслідок реакції звільнення - тромбоцитарний тромбопластин. Таким чином можна пояснити паралелізм хроноритмів первинного та вторинного гемостазу при інтоксикації важкими металами. Різка активація коагуляційного потенціалу в вечірні години дозволяє висловити припущення, що саме в цей період судинна стінка має мінімальну резистентність до токсичної дії талію, кадмію та свинцю.

Характерною особливістю хроноритмів гемокоагуляції при інтоксикації важкими металами була низька амплітуда часу рекальцифікації, протромбінового, тромбінового та активованого парціального тромбопластинового часу. Можливо, це пов'язано із здатністю важких металів блокувати тіолові групи ферментів, які є

ключовими протеазами в каскаді гемокоагуляції [2]. Не виключаємо також можливості виснаження ферментативних систем внаслідок тривалої дії металів.

Активація фібринолітичної системи мала компенсаторний характер, що забезпечувало ефективний лізис фібрину в періоди гіперкоагуляції. Не зважаючи на домінування ферментативної фібринолітичної активності плазми, необхідно відмітити також різке зростання неферментативного фібринолізу, переважно в денний період доби. Така особливість ритму вказує на утворення гормон-гепаринових комплексів, а саме з адреналіном, концентрація якого зростає вдень.

Висока активність процесів необмеженого протеолізу підтверджувала мембранотоксичну дію, особливо кадмію, з виходом лізосомальних ферментів в кров. Талій очевидно викликав менші пошкодження структури біологічних мембран, оскільки рівень протеолітичних ферментів не змінювався.

Підводячи підсумок, можна вказати, що пошкодження циркадіанної структури гемостазу при інтоксикації важкими металами створює передумови за яких нефротоксичність талію, кадмію і свинцю зростає, і, навпаки.

Літератури. 1.Бокарев И.Н., Щепотин Б.М., Ена Я.М. Внутрисосудистое свертывание крови.- К.: Здоров'я, 1989.-240 с. 2.Давлетов Э.Г., Сорокина В.С. К анализу биохимического механизма токсического действия тяжелых металлов: тиолопривные свойства ртути и кадмия// Тиоловые соединения в биохимических механизмах патологических процессов.- Ленинград, 1979.-С.33-36. 3.Заславская Р.М. Суточные ритмы свертывающей системы крови в норме и патологии и проблемы терапии.- М: Квартет, 1994.- 452 с. 4.Зербино Д.Д., Лукасевич Л.Л. Диссеминированное внутрисосудистое свертывание крови: Факты и концепции.-М.: Медицина, 1989.-256 с. 5.Лабораторные методы исследования в клинике /Меньшиков В.В., Делекторская Л.Н., Золотницкая Р.П. и др./ Под редакцией В.В.Меньшикова. - М.: Медицина, 1987.- 368 с. 6.Лабораторные методы исследования гемостаза /Балуда В.П., Баркаган З.С., Гольдберг Е.Д. и др.- Томск, 1980.- 312 с. 7.Микроэлементозы человека: этиология, классификация, органопатология/ Авцын А.П., Жаворонков А.А., Риш М.А., Строчкова Л.С.- М.: Медицина, 1991.- 496 с. 8.Barradas J.M., Ferreira da Silva E., Cardoso F.E. Impacte ambiental versus actividade industrial: Poluoçâo em metais pesados numa zona envolvente da Ria de Aveiro / Mem. e notic.: Publ. Mus. e Lab. miner. e geol. Univ. Coimbre.- 1991.- N112.- С. 37-55. 9.Burger J., Marquez M., Gochfeld M. Heavy metals in the hair of opossum from Palo Verde, Costa Rica // Arch. Environ. Contam. and Toxicol.- 1994.- 27, N4.- С. 472-476. 10.Gupta Amita, Gupta Aika, Shukla G.S. Development of brain free radical scavenging system and lipid peroxidation under the influence of gestational and lactational cadmium exposure//Hum. and Exp. Toxicol. -1995.-14, N5.-С.428-433. 11.Kaji T., Mishima A., Mashida M., Yabusaki K., Suzuki M., Yamamoto Fujiwara Y., Sakamoto M., Kozuka H. Comparative cytotoxicity of exogenous cadmium-metallothionein and cadmium ion in cultured vascular endothelial cells // Bull. Environ. Contam. and Toxicol. - 1995. - 54, N4. - С.501-506. 12.Kaji T., Suzuki M., Yamamoto C. Et al. Severe damage of cultured vascular endothelial cell monolayer after simultaneous exposure to cadmium and lead// Arch. Environ. Contam. and Toxicol.-1995.-28, №2.-С.168-172. 13.Kučera J., Bencko V., Sabbioni E., Venne M.T.van der. Reviwe of trace elements in blood, serum and urine for the Czech and Slovak populations and critical evaluation of their possible use as reference values//Sci. Total Environ.- 1995. - 166, N1-3. - С. 211-234. 14.Manca D., Ricard A.C., Tra Huu van, Chevalier G. Relation between lipid peroxidation and inflammation in the plumonary toxicity of cadmium//Arch. Toxicol.- 1994.- 68, N6.- С. 364-369. 14.Margeli A., Theocharis S., Skaltsas S., Skopelitou A., Kittas C., Mikoniatis M., Varonos D. Effect of cadmium pretreatment on liver regeneration after partial hepatectomy in rats//Arch. Toxicol.- 1994.- 68, N2.- С. 85-90. 15.Wolfspergar M., Hauser G., Gößler W., Schlagenhaufen C. Heavy metals in human hair samples from Austria and Italy: Influence of sex and smoking habits// Sci. Total Environ.- 1994.- 156, N3.- С. 235-242. 16.Yläranta Toivo. Effects or road traffic on heavy metal concentrations of plants// Agr. Sci. Finl.-1995.-4, №1.-С.35-48.

The Chronorhythms hemostasis and kidney function by heavy metals Intoxication

W.Pischak, T.Bojchuk

Abstract. In the experiments on male white rats the 30 days' influence of 0.5 mg/kg dose of tallium, lead chloride and 0.05 mg/kg dose of cadmium chloride on the chronorhythms of excretory, acid excretory, ion-regulating kidney function and hemostasis was investigated.

It was ascertained that in the investigated doses cadmium, in comparison with tallium, causes a more expressed disrhythmia of the processes kidney transport of natrium with the signs of nephron proximal department injury. The reduction of mediodiurnal levels of diuresis and glomerular filtration, high mesors of excretion of acidic valency indicated the injury of excretory and acid excretory kidney functions under the cadmium intoxication.

Tallium mainly injured distal nephron department. The restructure of chronorhythms of excretory and acid excretory kidney functions bore the compensatory nature.

It was ascertained that small doses of heavy metals activate the primary and secondary hemostasis especially in the evening time. The fibrinolytical blood activity rose in the same phase. At night the coagulative potential reduced. The authors connect the hypercoagulation with the endotheliotoxic heavy metals effect. The conclusion is the following: in the evening the vascular wall has minimal resistance to the metals toxic effect.

Key Words: *chronorhythm,heavy metals, hemocoagulation, kidneys*

Bukovynian State Medical Academy (Chernivtsi)