

УДК 57.044 : 612.117

*І.В. Іоффе, І.С. Гайдаш, О.В. Бурцев**ДЗ «Луганський державний медичний університет» МОЗ України, м. Рубіжне***ВПЛИВ ТОЛУОЛУ НА КИСЛОТНУ РЕЗИСТЕНТНІСТЬ  
ЕРИТРОЦИТІВ КРОВІ ЛЮДИНИ *IN VITRO***

Встановлено, що толуол при контакті з еритроцитами крові людини *in vitro* знижує їх кислотну резистентність, що має прояв у скороченні часу сферуляції еритроцитів, часу появи максимуму і тривалості гемолізу, а також у збільшенні висоти максимуму і кількості максимумів гемолізу. Ступінь виразності негативного впливу толуолу на кислотну резистентність еритроцитів збільшується по мірі збільшення тривалості контакту еритроцитів з толуолом. Мінімальні негативні зміни кислотної резистентності еритроцитів розвиваються при впливі на них толуолу протягом однієї години, максимальні – при тривалості впливу толуолу на еритроцити протягом трьох годин.

**Ключові слова:** еритроцити, толуол, кислотна резистентність, гемоліз.

Толуол (С<sub>6</sub>H<sub>5</sub>СН<sub>3</sub>), або метилбензол, – безбарвна рідина з неприємним запахом, що міститься в кам'яновугільній смолі. Молекулярна маса – 92,134, t плавлення – 94,99 °С, t кипіння – 110,625 °С, при t 22° С в 1 л води розчиняється 0,492 г толуолу. Застосовується як розчинник барвників, розріджувач для лаків, у виробництві вибухових речовин, барвників. Проникає в організм через шкіру або інгаляційно. В організмі толуол окиснюється з утворенням бензойної, гіпурової кислоти або глюкуронідів. У високих концентраціях пари толуолу діють токсично і наркотично [1, 2].

Процес руйнування еритроцитів з виходом гемоглобіну в плазму називають гемолізом. Передгемолітичні форми еритроцитів втрачають подвійну увігнутість і перетворюються на сфероцити, які в подальшому гемолізуються і стають клітинами-тінями [2–5].

Такі речовини, як бензол, толуол, динітробензол, хлороформ діють безпосередньо на мембрану еритроцитів, руйнуючи її. Інші утворюють метгемоглобін, і гемоліз, що розвивається при інтоксикації ними, є вторинним явищем [1–4, 6–8]. У доступній літературі дані про вплив толуолу на кислотну резистентність еритроцитів крові людини відсутні.

Метою дослідження було вивчити вплив толуолу на кислотну резистентність еритроцитів крові людини *in vitro*.

**Матеріал і методи.** Було використано 189 культур еритроцитів, які були отримані від 63 осіб чоловічої статі віком 19–25 років, середній вік – (22,5±1,2) роки. Всі донори еритроцитів були умовно здоровими особами і протягом 30 днів не вживали речовин, здатних вплинути на еритроцити. Робота виконувалась відповідно до загальноприйнятих біоетичних норм з дотриманням відповідних принципів Гельсінської декларації прав людини, Конвенції ради Європи про права людини і біомедицину та відповідних законів України відносно проведення експериментальних і клінічних досліджень.

Кров забирали ранком, натще, з пальця і вени ліктьового згину. Середня робоча концентрація толуолу, з якою взаємодіяли еритроцити, складала (300±30) мг/л. Експозиція еритроцитів з толуолом складала 1, 2 та 3 години. Кислотну резистентність еритроцитів визначали спектрофотометричним методом при довжині хвилі 720 нм. Кров розводили ізотонічним розчином натрію хлориду у співвідношенні 1 : 500, 3 мл розведеної крові змішували з рівним об'ємом 0,002 М розчину хлористоводневої кислоти на ізотонічному розчині натрію хлориду. Підвищення прозорості суспензії еритроцитів, яке відбувалося в процесі гемолізу, реєстрували кожні 30 секунд до постійної величини (у початковому періоді сферуляції еритроцитів – кожні 15 секунд для

© І.В. Іоффе, І.С. Гайдаш, О.В. Бурцев, 2016

більш точного встановлення моменту початку гемолізу). Із отриманих даних склали еритрограми та підраховували показник стійкості еритроцитів [3]. При цьому враховували час сферуляції (точка початку гемолізу), час появи максимуму (на якій хвилині), тривалість гемолізу – час від початку до закінчення гемолізу (у хвилинах і секундах), висоту максимуму (у відсотках еритроцитів, які розпалися), кількість максимумів. Референтну норму склали показники кислотної резистентності, що були отримані при досліді еритроцитів, які не були в безпосередньому контакті з парами толуолу.

Отримані цифрові дані статистично обробили з використанням критерію Стюдента.

**Результати.** Встановлено, що толуол при контакті з еритроцитами крові людини *in vitro* викликає суттєві зміни кислотної резистентності еритроцитів, що має прояв у скороченні часу сферуляції еритроцитів, скороченні часу появи максимуму і тривалості гемолізу, зростанні максимуму гемолізу і кількості таких максимумів (таблиця).

*Вплив толуолу на кислотну резистентність еритроцитів людини in vitro (M±m)*

Показник	Референтна норма	Термін дії толуолу		
		1 година	2 години	3 години
Час сферуляції, хв	3,02±0,09	2,78±0,10	2,66±0,10*	2,27±0,07**
Час появи максимуму, хв	4,33±0,10	4,06±0,14	3,98±0,09*	3,66±0,12**
Час появи максимуму, с	273±6	243,6±7,8	239,4±5,5**	219,6±8,9***
Тривалість гемолізу, хв	3,60±0,11	3,36±0,14	3,21±0,08*	2,87±0,09***
Тривалість гемолізу, с	240,0±6,7	201,6±8,5**	192,6±5,4***	172,2±6,4****
Висота максимуму гемолізу, %	17,5±0,4	18,66±0,57	19,70±0,65***	21,70±0,83****
Кількість максимумів, ум. од.	1,00±0,01	1,05±0,02	1,40±0,04***	1,52±0,05****

*Примітка.* \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001; \*\*\*\* p<0,001 порівняно з референтною нормою.

Експозиція еритроцитів крові людини з толуолом протягом 1 години викликала найменші зміни кислотної резистентності. Час сферуляції еритроцитів скоротився відносно референтної норми в 1,09 раза, що статистично значущим не було (p>0,05), але було інтерпретовано як тенденція до скорочення часу сферуляції еритроцитів, оскільки в експериментах з 2- і 3-годинною експозицією з толуолом час сферуляції скорочувався статистично значуще.

Після 1-годинної інкубації еритроцитів з толуолом також мало місце скорочення часу появи максимуму гемолізу, який був в 1,07 раза менше при розрахунку в хвилинах і в 1,12 раза менше при розрахунку в секундах, що в обох порівняннях значущої різниці з

аналогічними показниками референтної норми не мало (p>0,05). Тривалість гемолізу скорочувалась в 1,07 (p>0,05) і 1,19 (p<0,01) раза відповідно.

В кінці 1-годинного експерименту з толуолом висота максимуму гемолізу склала в середньому (18,66±0,57)%, що було в 1,07 раза вище аналогічного показника референтної норми. Однак зареєстрована зміна статистичної значущості не мала. Поряд з цим мало місце збільшення кількості максимумів гемолізу до (1,05±0,02) ум. од. проти (1,0±0,01) ум. од. для референтної норми (ступінь збільшення – 1,05; p>0,05).

Зміни кислотної резистентності еритроцитів, які контактували з толуолом протягом двох годин, були більш значущими.

В кінці 2-годинного експерименту з толуолом час сферуляції еритроцитів скорочувався в 1,14 раза (p<0,05), час настання гемолізу скорочувався в 1,09 раза; p<0,05). При обчисленні останнього параметра в секундах ступінь скорочення часу появи максимуму був ще більшим і становив 1,14 раза [(239,4±5,5) с

у 2-годинному експерименті проти (273±6) с для референтної норми; p<0,01].

Вплив толуолу на еритроцити протягом двох годин супроводжувався істотним скороченням тривалості гемолізу еритроцитів. Даний показник в аналізованому експерименті склав (3,21±0,14) хв, або (192,6±5,4) с, що відносно показників референтної норми було в 1,12 і 1,25 раза менше (p<0,05 і p<0,001). У порівнянні з аналогічними показниками, зареєстрованими в 1-годинному експерименті з толуолом, ступені скорочення тривалості гемолізу склали відповідно 1,05 і 1,04 раза, що, однак, статистично значущим не було.

Внаслідок більш масового гемолізу еритроцитів, стимульованого 2-годинним кон-

тактом з толуолом, висота максимуму гемолізу зростала. Якщо у інтактних еритроцитів (референтна норма) висота максимуму гемолізу в середньому становила  $(17,5 \pm 0,4) \%$ , то в кінці 2-ї години взаємодії еритроцитів з толуолом цей показник склав  $(19,7 \pm 0,65) \%$ , що було в 1,25 раза вище ( $p < 0,001$ ). Ступінь такого розходження щодо висоти максимуму гемолізу в 1-годинному експерименті становив 1,06 раза ( $p > 0,05$ ).

Експозиція еритроцитів з толуолом протягом двох годин супроводжувалася також збільшенням кількості максимумів гемолізу. Середнє число останніх у 2-годинному експерименті склало  $(1,4 \pm 0,04)$  ум. од., що в 1,4 раза перевищувало аналогічний показник референтної норми, а також було в 1,33 раза вище подібного показника в 1-годинному експерименті ( $p < 0,01$  для обох зіставлень).

В кінці експерименту з 3-годинною експозицією еритроцитів і толуолу час сферуляції зазначених клітин скоротився в 1,33 раза ( $p < 0,01$ ). При цьому час настання максимуму гемолізу еритроцитів наступав при обчисленні в хвиликах в 1,18 раза ( $p < 0,01$ ) швидше, ніж це мало місце у випадку інтактних еритроцитів (референтна норма). При обчисленні цього показника в секундах час появи максимуму гемолізу склав у середньому  $(219,6 \pm 8,9)$  с, що було в 1,25 раза менше референтної норми ( $p < 0,01$ ).

Під впливом 3-годинної дії толуолу тривалість гемолізу еритроцитів скорочувалася відносно референтної норми в 1,25 раза при обчисленні даного показника в хвиликах ( $p < 0,01$ ) і в 1,39 раза при обчисленні в секундах ( $p < 0,0001$ ). Проти аналогічних показників, зазначених у 2-годинному експерименті з толуолом, ступені відмінності склали 1,12 раза при обчисленні як в хвиликах, так і в секундах ( $p < 0,05$ ), а проти аналогічних показників, зазначених в 1-годинному експерименті з толуолом, в 1,17 раза також в обох зіставленнях ( $p < 0,05$ ). Тобто із збільшенням тривалості контакту еритроцитів з толуолом тривалість гемолізу прогресивно скорочується.

Висота максимуму гемолізу еритроцитів після 3-годинного контакту з толуолом при проведенні тесту кислотної резистентності склала в середньому  $(21,7 \pm 0,83) \%$ , опинившись тим самим вище референтної норми в 1,24 раза ( $p < 0,001$ ), а також в 1,10 і в 1,16 раза вище аналогічних показників, зареєстрованих

у 2- і 1-годинному експериментах відповідно ( $p > 0,05$  і  $p < 0,05$  для двох останніх зіставлень).

Експозиція еритроцитів з толуолом протягом трьох годин супроводжувалася збільшенням кількості максимумів гемолізу при виконанні тесту кислотної резистентності. Наприкінці зазначеного досліду кількість максимумів склала в середньому  $(1,52 \pm 0,05)$  ум. од., що відносно референтної норми було в 1,52 раза більше ( $p < 0,0001$ ). Проти такого показника, зареєстрованого в досліді з 2-годинною експозицією еритроцитів з толуолом, ступінь збільшення склав 1,09 раза, що статистично значущим не було. Відносно цього ж показника в 1-годинному експерименті з толуолом ступінь збільшення дорівнював 1,44 раза ( $p < 0,001$ ).

**Обговорення результатів.** Хімічний гемоліз викликає широкий спектр хімічних сполук: ефір, хлороформ, бензин, бензол, толуол тощо. Такі речовини, як бензол, толуол, динітробензол, хлороформ діють безпосередньо на мембрану еритроцитів, руйнуючи її. Інші утворюють метгемоглобін, і гемоліз, що розвивається при інтоксикації ними, є вторинним явищем [1–4, 6, 8].

Клітинні мембрани є надзвичайно динамічним елементом. Їх будова змінюється у відповідності з умовами навколишнього середовища і потреб клітини. Токсична дія багатьох речовин пов'язана з їх впливом на стан мембранних структур. Вплив може бути прямим і опосередкованим. Найбільш ймовірними механізмами опосередкованого пошкодження біологічних мембран при інтоксикаціях є: 1) активація перекисного окиснення ліпідів; 2) активація фосфоліпазної активності. Можлива дія ксенобіотиків і безпосередньо на ліпідний бішар або білкові компоненти біомембран [2, 5]. Ефекти, які розвиваються внаслідок цього, можуть бути як неспецифічними (відсутність суворої залежності між структурою токсиканту і динамічним ефектом), так і суворо специфічними. Специфічність є наслідком дії токсикантів на ензими і рецепторні білкові комплекси. Часто дія носить змішаний «напівспецифічний» характер. В результаті неспецифічної дії численних токсикантів (бензолу, толуолу, динітробензолу, хлороформу, мил, сапонінів, змочуючих речовин, важких металів та інших денатуруючих агентів) може порушуватися структурна цілісність мембран, що призводить до деформації, лізису клітини та її заги-

белі. При дії таких речовин на мембрани еритроцитів розвивається гемоліз [2, 4, 6–8].

Зміни кислотної резистентності еритроцитів під впливом толуолу свідчать про зниження стабільності еритроцитарних цитоплазматичних мембран. У зв'язку з тим, що віковий склад еритроцитів, що циркулюють у крові, неоднорідний (маються їх юні, зрілі та старіючі фракції), то зміни зовнішніх мембран цих фракцій не можуть бути однаковими за часовим показником, що обумовлено різним ступенем стійкості самих мембран до агресивного впливу. Це знайшло своє відображення в кількостях максимумів гемолізу.

#### Висновки

1. Контакт еритроцитів крові людини з толуолом *in vitro* негативно впливає на кислотну резистентність еритроцитів, а саме знижує її. Це має прояв у скороченні часу

сферуляції еритроцитів, часу появи максимуму гемолізу і тривалості останнього, у збільшенні висоти максимуму і кількості цих максимумів.

2. Ступінь виразності негативного впливу толуолу на кислотну резистентність еритроцитів збільшується по мірі збільшення тривалості контакту еритроцитів з толуолом. Найменші негативні зміни кислотної резистентності еритроцитів розвиваються при впливі на них толуолу протягом однієї години, найбільші – при тривалості впливу толуолу на еритроцити протягом трьох годин.

**Перспективність дослідження.** В подальшому планується вивчення метаболічного статусу еритроцитів під впливом толуолу, а також розробка способу стабілізації мембран еритроцитів за допомогою фармакологічних препаратів.

#### Література

1. Гордон А. Спутник химика. Перевод на русский язык / А. Гордон, Р. Форд ; пер. с англ. Е.Л. Розенберг, С.И. Коппель. – М.: Мир, 1976. - 544 с.
2. Шпагина Л.А. Структура и функция эритроцитов при воздействии комплекса токсических веществ / Л.А. Шпагина, Т.М. Сухаревская, М.И. Лосева // Здоровье человека в Сибири: Тез. докл. – Красноярск, 1990. – С. 140–141.
3. Гительзон И.И. Эритрограммы как метод клинического исследования крови / И.И. Гительзон, И.А. Терсков. – Красноярск, 1959. – 249 с.
4. Влияние физических нагрузок у спортсменов, занимающихся греко-римской борьбой, на морфологию и кислотную резистентность эритроцитов / В.П. Ляпин, Е.В. Яковлева, С.Н. Галий, В.В. Андреева // Український медичний альманах. – 2007. – № 3. – С. 12–15.
5. Маматаева А.Т. Егеуқұйрықтар эритроциттерінің мембранасы резистенттілігіне жүзім сүйегі сығындысының әсері / А.Т. Маматаева, М.К. Мырзахметова, Р.С. Өтегалиева // Вестник КазНУ (сер. Экол.), 2008. – Т. 23, № 2. – С. 84–88.
6. Вплив амізону на кислотну резистентність еритроцитів *in vitro* / І.С. Гайдаш, В.В. Флегонтова, І.О. Лаврінчук та ін. // Український хіміотерапевтичний журнал. – 2001. – № 2. – С. 21–24.
7. Казімірко Н.К. Кислотна резистентність еритроцитів при постгеморагічній анемії в умовах попереднього перегрівання організму // Фізіологічний журнал АН УРСР. – 1969. – № 1. – С. 108–110.
8. Омарова А.С. К механизму адаптации к гипоксии, вызванной воздействием ксенобиотика-толуола на организм крыс / А.С. Омарова, Б.Н. Алибаева // Хирургия, морфология, лимфология. Научно-практический журнал. – 2007. – Т. 4, № 7. – С. 66–67.

**И.В. Иоффе, И.С. Гайдаш, А.В. Бурцев**

#### ВЛИЯНИЕ ТОЛУОЛА НА КИСЛОТНУЮ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO*

Статья посвящена изучению влияния толуола на кислотную резистентность эритроцитов крови человека *in vitro*. Установлено, что толуол при контакте с эритроцитами крови человека *in vitro* снижает их кислотную резистентность, что проявляется сокращением времени сферуляции эритроцитов, времени появления максимума и длительности гемолиза, а также в увеличении высоты максимума и количества максимумов гемолиза. Степень выраженности негативного влияния толуола на кислотную резистентность эритроцитов увеличивается по мере увеличения длительности контакта эритроцитов с толуолом. Минимальные негативные изменения кислотної резистентности

эритроцитов развиваются при воздействии толуола в течение 1 часа, максимальные – при воздействии в течение 3 часов.

**Ключевые слова:** эритроциты, толуол, кислотная резистентность, клеточные мембраны.

**I.V. Ioffe, I.S. Gaidash, A.V. Burcev**

**INFLUENCE OF TOLUENE ON THE ACID RESISTANCE OF ERYTHROCYTES OF HUMAN BLOOD  
IN VITRO**

The article is devoted to the study of the influence of toluene on the acid resistance of erythrocytes of human blood in vitro. It is established that the toluene in contact with human blood cell in vitro reduces their acid resistance, which is manifested by reduced time of spherulation of red blood cells, the time of occurrence of maximum of hemolysis and duration of hemolysis, as well as to increase the maximum height and number of peaks of hemolysis. The severity of the negative impact of toluene on the acid resistance of erythrocytes increases with duration of contact of erythrocytes with toluene. Minimum negative change of the acid resistance of erythrocytes develop when exposed to toluene for 1 hour, maximum with exposure for 3 hours.

**Key words:** erythrocytes, toluene, acid resistance, cell membrane.

*Поступила 12.05.16*