

Janusz ŻARNOWSKI, Halina SMOLAREK

**Zmiany ilościowe białek surowicy krwi u szczurów  
pod wpływem ostrego zatrucia octanem ołowiu**

Количественные изменения белкового состава сыворотки крови у крыс  
при остром отравлении ацетатом свинца

The Quantitative Changes in Blood Serum Proteins in Rats under the Influence  
of Acute Intoxication with Lead Acetate

Podczas zatrucia ołowiem lub jego związkami krew spełnia funkcję transportującą i dlatego związki wchodzące w skład krwi są szczególnie silnie narażone na szkodliwe oddziaływanie ołowiu. Potwierdzają to dość liczne badania opracowane w tym zakresie. Obserwacje poczynione przez Teisingera i wsp. (9), wykazały, że ołów zawarty w krwinkach jest głównie połączony ze związkami białkowymi erytrocytów. Afonowa (1) udowodniła poważne zmniejszenie ilości grup karboksylowych, aminowych oraz tiolowych w krwi u królików po zadziałaniu ołowiem. Zauważono także, że ołów unieczynnia we krwi enzymy przez zablokowanie grup tiolowych (2) w białkowej części enzymu lub prawdopodobnie w wyniku wymiany na ołów innych jonów metali (5). Jedną z podstawowych funkcji w organizmie spełniają białka surowicy krwi, których zachowanie pod wpływem ołowiu jest przedmiotem niniejszej pracy.

Dotychczasowe badania (4, 7, 8) przeprowadzone na zwierzętach laboratoryjnych wykazały, że ołów zmienia poziom białka całkowitego oraz skład procentowy poszczególnych frakcji białkowych surowicy krwi. Ilość opracowań jest jednak niewielka, a zaobserwowany charakter zmian dość zróżnicowany. Nasza praca wykonana na szczurach ma na celu prześledzenie zachowania się podstawowych pięciu frakcji białkowych (albuminy,  $\alpha_1$  i  $\alpha_2$ -globuliny,  $\beta$ -globuliny,  $\gamma$ -globuliny) pod wpływem dużych dawek octanu ołowiu podawanego dootrzewnowo.

ORGANIZACJA I METODYKA BADAŃ

Do przeprowadzonych badań użyto laboratoryjnych szczurów białych z własnej hodowli, obu płci, w wieku od 11 do 13 miesięcy o c. ciała: samice — od 250 g do

340 g oraz samce — od 370 g do 470 g. Zwierzęta podczas doświadczeń były karmione granulowaną mieszanką dla myszek i szczurów produkcji Wytwórni Pasz w Łowiczu w ilości 20 g dziennie, otrzymywały również mleko (10 g dziennie), wodę w dowolnych ilościach oraz okresowo marchew. W czasie poprzedzającym eksperyment szczury systematycznie naświetlano promieniami ultrafioletowymi.

Przed podaniem czynnika trującego zwierzęta w ilości 26 sztuk podzielono na trzy grupy: 2 grupy po 10 sztuk i 1 grupa 6 sztuk. Do poszczególnych grup brano tę samą liczbę samców i samic oraz starano się dobrać zwierzęta zbliżone ciężarem. Zwierzęta poddawano zatruciu drogą dootrzewnową jednorazowymi dawkami wodnego roztworu octanu ołowiawego. Do zatrucia szczurów używano dawek: 20 mg Pb (1 grupa), 40 mg Pb (2 grupa) i 80 mg Pb (3 grupa) na kilogram c. ciała zwierzęcia. Najwyższą zastosowaną dawkę trującą ołowiu ustalono poniżej  $DL_{50}$ , która wg Spectora (6) wynosi 150 miligramów octanu ołowiawego (tj. 95,5 mg Pb) na kilogram c. ciała. Dobrane w ten sposób dawki zmniejszają ilość padnięć zwierząt, co pozwala na pełniejsze ich wykorzystanie podczas doświadczeń. W celu otrzymania potrzebnej do badań surowicy pobierano jednorazowo około 0,3 ml krwi do kapilar szklanych z żyły ogonowej zwierzęcia. Krew poddawano wirowaniu, a uzyskaną surowicę niezwłocznie używano do oznaczeń.

W poszczególnych grupach zwierząt wykonano badania składu procentowego frakcji białkowych i białka całkowitego surowicy na pięć dni przed podaniem czynnika trującego oraz po upływie jednego i sześciu dni od zatrucia. Przyjęty schemat częstotliwości wykonywanych oznaczeń podyktowany był możliwością pobierania krwi od małych zwierząt bez wywołania zmian w poziomie białek surowicy. Białko całkowite oznaczono refraktometrem zanurzeniowym produkcji Carl Zeiss Jena (NRD) z nasadką pozwalającą na użycie do analizy małej ilości surowicy. Zachowanie się poszczególnych frakcji białkowych surowicy (albuminy,  $\alpha_1$  i  $\alpha_2$ -globuliny,  $\beta$ -globuliny,  $\gamma$ -globuliny) badano przy pomocy rozdziału elektroforetycznego na bibule zgodnie z ogólną zasadą przyjętą w metodzie opracowanej przez Durruma (3). Elektroforezę przeprowadzono w standardowym aparacie produkcji Pracowni Przyrządów Fizycznych Uniwersytetu Wrocławskiego w następujących warunkach: bufor weronalowy o  $pH=8,6$  i sile jonowej 0,1, napięcie 5 V/cm, natężenie 0,25 — 0,30 mA/cm szerokości paska, czas elektroforezy 15—18 godzin, bibuła Whatman Nr 1. Po rozdziale elektroforetycznym paski bibuły suszono w suszarce w temp. 105°C, a następnie barwiono przez 10 minut 0,2% roztworem (2,5 części alkoholu etylowego i 1 część kwasu octowego lodowatego) azokarminu B. Barwnik niezwiązany z białkiem usuwano przez trzykrotne ( $3 \times 15$  min.) odbarwienie roztworem alkoholu etylowego, kwasu octowego i wody w proporcji (2,5:1,0:6,5) i paski suszono na powietrzu w temperaturze pokojowej. Frakcje białkowe wycinano z pasków bibuły w całości i każdą eluowano 4 ml 0,1 n roztworu NaOH przez okres 4 godzin, po czym odczytywano ekstynkcję przy pomocy spektrofotometru VSU 2-P produkcji Carl Zeiss Jena (NRD) przy długości fali 570 nm. Do ustalenia końcowych wniosków z przeprowadzonych badań zastosowano analizę statystyczną.

#### WYNIKI BADAŃ

W tab. 1 podano wartości normalne białek surowicy z uwzględnieniem podziału szczurów na grupy oraz zmiany w poziomie i w składzie procentowym białek pod wpływem różnych dawek ołowiu po jednym i po sześciu dniach zatrucia. Za wartości prawidłowe białka całkowitego

Tab. 1. Poziom i skład procentowy białek w surowicy krwi szczurzej w badaniach kontrolnych oraz w pierwszym i szóstym dniu po zatruciu octanem ołowiu  
The level and the proportional composition of blood serum proteins in rats during the control examinations and on the first and sixth day after intoxication with lead acetate

Cecha	średnia	Wartości kontrolne												
		wartości prawidłowe						Wartości średnie w grupach						
		od		do		grupa I 20 mg Pb/kg		grupa II 40 mg Pb/kg		grupa III 80 mg Pb/kg		po zatruciu		
		odchylenie standardowe				przed zatruciem	1 dzień	6 dni	przed zatruciem	1 dzień	6 dni	przed zatruciem	1 dzień	6 dni
Poziom														
białko całkowite	6,213	0,281	5,65	6,77	6,19	6,12	6,15	6,22	5,78**	5,48**	6,22	5,77**	5,46**	
albuminy	2,723	0,250	2,22	3,22	2,71	2,73	2,57	2,72	2,52*	2,35**	2,73	2,37**	1,96	
globuliny	3,490	0,187	3,12	3,86	3,48	3,39	3,58	3,50	3,26*	3,13**	3,49	3,40	3,50	
Współczynnik	0,784	0,090	0,60	0,96	0,78	0,80	0,72	0,78	0,77	0,76	0,79	0,70**	0,56**	
albuminy														
globuliny														
albuminy	43,791	2,875	38,04	49,54	43,71	44,57	41,70	43,63	43,52	43,00	44,00	41,09**	35,86**	
$\alpha_1$ -globuliny	12,753	1,420	9,91	15,59	12,85	11,97	12,52	12,78	12,53	13,26	12,67	14,05**	16,20**	
$\alpha_2$ -globuliny	10,025	1,749	6,52	13,52	10,50	10,01	10,20	11,26	10,66	11,55	8,51	9,76	12,28**	
$\beta$ -globuliny	18,211	1,952	14,31	22,11	18,46	18,52	19,59	16,93	19,40	17,14	19,34	19,40	19,90	
$\gamma$ -globuliny	15,220	1,402	12,42	18,02	14,48	14,93	15,99	15,40	13,89	15,05	15,48	15,70	15,76	

\* różnice istotne na poziomie  $P=0,05$ .

\*\* różnice istotne na poziomie  $P=0,01$ .

przed zatruciem przyjęto jego poziom w granicach 5,65% — 6,77% przy wartości średniej 6,21%. Zatrucie dawką 20 mg Pb/kg nie miało statystycznie istotnego wpływu na obniżenie poziomu białka całkowitego surowicy. Stwierdzono natomiast wysoce istotny spadek białka przy zatruciu dawkami 40 mg Pb/kg i 80 mg Pb/kg. c. ciała. Obniżenie wykazano w pierwszym i w szóstym dniu po zatruciu.

Poziom albumin przed zatruciem wynosił średnio 2,72%, a wartości prawidłowe przyjęto w przedziale 2,22% — 3,22%. Zatrucie dawką 20 mg Pb/kg nie miało wpływu na zmianę poziomu albumin, natomiast dawka 40 mg Pb/kg, a szczególnie 80 mg Pb/kg wpłynęła na wysoce istotne obniżenie poziomu tej frakcji.

Wartości prawidłowe poziomu globulin przed zatruciem mieściły się w granicach 3,12% — 3,86%, a wartość średnia wynosiła 3,49%. Poziom globulin uległ istotnemu zmniejszeniu tylko przy dawce 40 mg Pb/kg, natomiast dawki 20 mg Pb/kg i 80 mg Pb/kg nie miały istotnego wpływu na ich zmianę.

Współczynnik albuminy/globuliny przed zatruciem wynosił średnio 0,78, a wartości prawidłowe przyjęto w granicach 0,60—0,96. Przy zatruciu dawką 20 mg Pb/kg zmiana współczynnika miała charakter losowy. Nie stwierdzono również istotnych zmian wartości współczynnika przy zatruciu dawką 40 mg Pb/kg, co oznacza, że przy tej dawce spadek albumin był proporcjonalny do spadku globulin. Przy dawce 80 mg Pb/kg spadek albumin, a brak istotnych zmian globulin wpłynęły na wysoce znamienne zmniejszenie współczynnika albuminy/globuliny już w pierwszym dniu po zatruciu. Obniżenie współczynnika przy tej dawce było około 2,5-krotne w szóstym dniu od zatrucia w porównaniu z pierwszym dniem działania toksycznego ołowiu.

Skład procentowy białek surowicy przed zatruciem przedstawiał się następująco: albuminy stanowiły 43,8%,  $\alpha_1$  — globuliny 12,8%,  $\alpha_2$  — globuliny 10,0%,  $\beta$  — globuliny 18,2%,  $\gamma$  — globuliny 15,2% poziomu białka całkowitego. Zmiany składu procentowego białek zarówno po zatruciu dawką 20 mg Pb/kg, jak i 40 mg Pb/kg miały charakter losowy. Zatrucie dawką 80 mg Pb/kg miało istotny wpływ na zmianę składu procentowego białek już w pierwszym, a szczególnie w szóstym dniu od zatrucia. Dawka ta w pierwszym dniu po zatruciu spowodowała zmniejszenie udziału albumin przy wzroście  $\alpha_1$  — globulin, a w szóstym dniu po zatruciu stwierdzono znaczny spadek udziału albumin przy wzroście  $\alpha_1$  i  $\alpha_2$  — globulin.

#### OMÓWIENIE WYNIKÓW

Zachowanie się białek surowicy krwi w zatruciach ołowiem jest dotychczas mało opracowane. Jedną z przyczyn tego faktu jest częstsze

podejmowanie badań związanych z wczesną diagnostyką ołowicy, podczas gdy białka wydają się dość stabilne i stosunkowo mało reagujące w warunkach narażenia zawodowego. W naszych zainteresowaniach dotyczących występowania uszkodzeń ustroju ołowiem zwróciliśmy również uwagę na białka. Wyniki obserwacji porównujemy z rezultatami trzech odmiennych technik doświadczalnego zatruwania zwierząt octanem ołowiu. Opracowanie pierwsze S r o c z y ń s k i e g o i w s p. (7) dotyczy ostrego dożylnego zatruwania 10 królików zasadowym octanem ołowiu w dawce dziennej 4 mg Pb/kg c. ciała w ciągu 7—14 dni aż do śmierci zwierzęcia. W eksperymencie drugim również S r o c z y ń s k i i w s p. (8) obserwowali skutki przewlekłego zatruwania 10 królików zasadowym octanem ołowiu, stosując dawkę 4 mg Pb/kg c. ciała zwierzęcia co 7 dzień przez okres 4—6 miesięcy. W doświadczeniu trzecim włoscy autorzy G r a n a t i i w s p. (4) badali zachodzące zmiany w składzie białek surowicy krwi u 14 szczurów, którym podawali octan ołowiu sondą do żołądka co drugi dzień w ilości 0,15 g przez okres 30—60 dni. Do opisów porównawczych zachęcił nas również fakt, że autorzy ci wykonywali oznaczenia ilościowe zblizoną techniką laboratoryjną. Dla łatwiejszego zestawienia stosowanych dawek obliczono przybliżoną sumaryczną ilość czynnika trującego, jakiej użyto w poszczególnych badaniach. Po przeliczeniu okazało się, że w pierwszym doświadczeniu stosowano łączną dawkę 21 mg Pb do 42 mg Pb na kg c. ciała w zależności od czasu przeżycia zwierzęcia, w pracy drugiej odpowiednio od 51 mg Pb do 77 mg Pb, a w trzeciej od około 1433 mg Pb aż do 2861 mg Pb. W naszej pracy, starając się zjawisko uprościć, posługiwaliśmy się jednorazowymi dawkami octanu ołowiu (20 mg Pb, 40 mg Pb, 80 mg Pb), obserwując w dwóch okresach skutek ich działania .

Ogólnie należy stwierdzić, że większość zwierząt pod wpływem toksycznego działania ołowiu reaguje spadkiem białka całkowitego. W naszej pracy to zjawisko wystąpiło począwszy od dawki 40 mg Pb/kg. W opracowaniach dotyczących przewlekłego zatruwania obserwowano w początkowej fazie intoksykacji zwiększenie białka całkowitego, a następnie stałą tendencję zmniejszania się jego poziomu przy wydłużaniu się czasu ekspozycji na ołów. Spadek zawartości albumin, który wystąpił u nas od dawki 40 mg Pb/kg, potwierdzają inne badania, jedynie S r o c z y ń s k i i podaje wzrost poziomu tej frakcji jako końcowy efekt przewlekłego zatruwania królików. Obniżenie ilości albumin występuje wyraźniej niż podwyższenie zawartości globulin, chociaż zjawisko to zaobserwowano we wszystkich trzech typach zatruc, a także w naszych badaniach. Wzrost ilości globulin jest bardzo zróżnicowany i w zależności od techniki zatruwania często obejmuje inne rodzaje tych frakcji. G r a n a t i i w s p. podają, że po 30 dniach trucia szczurów największy wzrost dotyczył  $\alpha_1$  i  $\beta$  — globulin,

a po 60 dniach dalszy wzrost  $\alpha_1$  — globulin oraz zmniejszenie zawartości  $\beta$  — globulin i umiarkowane podwyższenie  $\gamma$  — globulin. W ostrym zatruciu królików Sroczyński odnotował wzrost względnej i bezwzględnej ilości globulin, z tym że wzrost ten obejmował  $\alpha_1$  i  $\alpha_2$  — globuliny, a najwyraźniej  $\beta$  — globuliny przy zmiennym zachowaniu się  $\gamma$  — globulin. W przewlekłym zatruciu królików obserwowano w pierwszej fazie wzrost globulin z rozpoczynającym się spadkiem tych frakcji począwszy od czwartego miesiąca intoksykacji, w tym okresie najwyraźniejszemu zmniejszeniu uległy  $\alpha_1$  i  $\alpha_2$  — globuliny oraz  $\beta$  — globuliny. W naszych badaniach obserwowaliśmy po dawce 40 mg Pb/kg istotne zmniejszenie poziomu globulin, a po dawce 80 mg Pb/kg wzrost  $\alpha_1$  i  $\alpha_2$  — globulin. Nie stwierdziliśmy istotnych zmian w zawartości  $\beta$  i  $\gamma$  — globulin. Naszym zdaniem różnice występujące w wynikach badań uzyskanych przez poszczególnych autorów mogą być spowodowane stosowaniem odmiennych technik zatrucia.

### Wnioski

1. W naszych badaniach nie stwierdzono, aby zatrucie jednorazową dawką 20 mg Pb/kg miało istotny wpływ na zachowanie się poziomu białka i na zmiany składu procentowego białek surowicy krwi szczurzej.
2. Zatrucie dawką 40 mg Pb/kg wykazuje istotny wpływ na obniżenie zarówno poziomu albumin, jak i globulin, nie powodując przy tym istotnych zmian w składzie procentowym frakcji białek surowicy.
3. Zatrucie dawką 80 mg Pb/kg dało znaczny spadek frakcji albuminowej oraz wzrost frakcji  $\alpha_1$  i  $\alpha_2$  — globulin.
4. Stwierdzono pogłębianie się zmian poziomu i składu białek pod wpływem toksycznego działania ołowiu w okresie sześciu dni od zatrucia.

### PIŚMIENNICTWO

1. Afonowa W. N.: Farmakologija i toksykologija **21**, 64, 1958.
2. Clarke E. G. C.: J. Small Anim. Pract. **14**, 183—193, 1973.
3. Durrum E. L.: J. Am. Chem. Soc. **72**, 2942, 1950.
4. Granati A., Scavo D., Peruzi A. D.: Folia Med. Nap. **40**, 53—61, 1957.
5. Rosen O. M., Rosen S. M., Horecker B. L.: Arch. Biochem. Biophys. **112**, 411—420, 1965.
6. Spector W.: Handbook of Toxicology, vol. 1, Acute Toxicities, W. B. Saunders Company — Philadelphia and London 1966, s. 176.
7. Sroczyński J., Kujawska A., Piekarski B.: Med. Pracy **2**, 77—81, 1964.
8. Sroczyński J., Piekarski B.: Post. Hig. Med. Dośw. **17**, 603—608, 1963.
9. Teisinger J., Zumanowa R., Zezula J.: A.M.A. Arch. Indust. Health **17**, 295, 1958.

Otrzymano 17 X 1975.

## РЕЗЮМЕ

Изучалось поведение общего белка и изменение процентного состава пяти основных белковых фракций (альбуминов,  $\alpha_1$ - и  $\alpha_2$ -глобулинов,  $\beta$ -глобулина и  $\gamma$ -глобулина) сыворотки крови у крыс, которым внутривентриально вводили однократные дозы ацетата свинца.

Эксперимент проводился в трех группах животных. В отдельных группах применялись дозы 20, 40 и 80 мг Pb/кг веса животного. Определения проводились спустя 1 и 6 дней после отравления.

Доза 20 мг Pb/кг не оказывала существенного влияния как на поведение общего белка, так и на изменение процентного состава сыворотки крови.

Доза 40 мг Pb/кг влияет на существенное понижение как уровня альбуминов, так и глобулинов, не вызывая при этом существенных изменений процентного состава белковых фракций сыворотки.

Доза 80 мг Pb/кг вызывает значительное понижение альбуминовой фракции при одновременном росте  $\alpha_1$ - и  $\alpha_2$ -глобулинов.

## SUMMARY

The behaviour of total protein and changes occurring in the proportional composition of five basic protein fractions (albumin,  $\alpha_1$  and  $\alpha_2$ -globulins,  $\beta$ -globulin,  $\gamma$ -globulin) in the blood serum in rats during acute intoxication with a single dose of lead acetate were observed. Lead acetate was introduced by a peritoneal injection. The experiment was carried out on three groups of animals. Doses of 20 mg Pb, 40 mg Pb, and 80 mg Pb per kilogram of the animal's weight were used in each particular group. The measurements were taken after one day and after six days from intoxication.

The dose of 20 mg Pb/kg of body weight has no significant influence neither on the behaviour of total protein nor on the changes in the proportional composition of blood serum proteins.

The dose of 40 mg Pb/kg significantly influences the decrease in the albumin level as well as globulins and does not effect the changes in the proportional composition of serum protein fractions.

The dose of 80 mg/kg of body weight causes a considerable decrease in the albumin fraction and an increase in  $\alpha_1$  and  $\alpha_2$ -globulins.

