

Міністерство освіти і науки України
Національний університет «Києво-Могилянська академія»
Факультет природничих наук

Кафедра лабораторної діагностики біологічних систем

Магістерська робота

на тему «**КОНФОРМАЦІЙНІ ЗМІНИ БІЛКІВ КРОВІ ЛЮДИНИ ЗА
ВПЛИВУ СПОЛУК ВАЖКИХ МЕТАЛІВ**»

Виконала: студентка 2-го року навчання
Галузь знань: 09 Біологія
Спеціальність: 091 Біологія
Освітньо-наукова програма: Лабораторна діагностика
біологічних систем

Лисенко Каріна Ігорівна

Наукові керівники:

Дмитруха Н. М. _____
д. б. н., с. н. с., завідувача
лабораторії промислової токсикології і
гігієни праці
Руссу І.З. _____
кандидат біологічних наук, доцент

Рецензент
Демецька Олександра Віталіївна _____
кандидат біологічних наук, доцент
Кваліфікаційну роботу захищено
з оцінкою _____

Секретар ЕК
Пахаренко М. В.
« ____ » червня 20__ року

Київ – 2023

ЗМІСТ

	Стор.
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ _____	4
ВСТУП _____	5
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ _____	7
1.1. Загальна характеристика білків плазми крові _____	7
1.2. Джерела та шляхи надходження важких металів в організм _____	8
1.3. Особливості токсичної дії важких металів _____	10
1.3.1. Токсичність солей свинцю _____	10
1.3.2. Токсичність солей ртуті _____	11
1.3.3. Токсичність солей кадмію _____	12
1.3.4. Токсичність солей міді _____	13
1.3.5. Токсичність солей цинку _____	13
1.3.6. Токсичність солей марганцю _____	14
1.4. Вплив важких металів на білки плазми крові _____	14
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА	
РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ	
ДОСЛІДЖЕННЯ _____	17
2.1. Об'єкти дослідження _____	17
2.2. Реактиви, обладнання та матеріали _____	17
2.3. Методика дослідження _____	19
2.4. Методи дослідження _____	20
2.4.1. Метод спектрофотометрії _____	21
2.4.2. Метод центрифугування _____	21
2.4.3. Метод визначення білка в надосадовій рідині бромкрезоловим зеленим _____	22
2.4.4. Метод статистичної обробки даних _____	22

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ	24
ОБГОВОРЕННЯ	
3.1. Оптична густина розчинів IgG та альбуміну після інкубації з розчинами солей важких металів	25
3.2. Оптична густина розчинів IgG та альбуміну після інкубації з розчинами солей мікроелементів	28
3.3. Вміст IgG та альбуміну після інкубації з розчинами солей важких металів	32
3.4. Вміст IgG та альбуміну після інкубації з розчинами солей мікроелементів	36
УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ	41
ВИСНОВКИ	47
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	48

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

нм – нанометри

BCG – метод бромкрезолового зеленого

Cd – кадмій

Cu – купрум (мідь)

Hg – гідраргірум (ртуть)

IgG – імуноглобулін G

Mn – манган

Pb – плюмбум (свинець)

Zn – цинк

ВСТУП

Білки крові виконують безліч важливих функцій у людському організмі, включаючи транспортування кисню, регулювання імунної відповіді та забезпечення коагуляції крові. Проте вони можуть зазнавати впливу різних факторів, включаючи іони важких металів, які здатні спричинити конформаційні (структурні) зміни у білках крові.

Важкі метали є несприятливими забруднювачами довкілля, також ці сполуки відомі своєю токсичною дією на різні органи і системи, включаючи молекулярні ефекти, зокрема взаємодію з білками. Сполуки важких металів, таких як свинець, ртуть та кадмій, мають тенденцію накопичуватися у тканинах організму, включаючи кров. Коли ці метали взаємодіють із білками крові, вони можуть зумовити їх конформаційні зміни, що у подальшому вплине на їхні функції та властивості [14].

Вивчення конформаційних змін у білках крові під впливом сполук важких металів вимагає використання різноманітних методів дослідження. Застосування цих методів дозволяє отримувати детальну інформацію про зміни в білках крові та визначати їх вплив на функціонування організму.

Дослідження в галузідії важких металів на конформаційні зміни білків крові людини може мати важливі наслідки для здоров'я людини. Такі дослідження можуть допомогти зрозуміти механізми токсичності важких металів, встановити біомаркери для оцінки ризику хвороб, пов'язаних із їх дією, а також розробити нові методи лікування цих захворювань [30].

Вибір даного аспекту дослідження обґрунтовується тим, що білки крові відіграють важливу роль у функціонуванні людського організму, і вплив сполук важких металів на них може призвести до порушення біохімічних процесів та вплинути на різні органи та системи організму.

На сьогоднішній день проведено доволі багато досліджень щодо дії сполук важких металів на білки крові та їх конформаційні зміни. Деякі дослідження показують, що ці сполуки можуть викликати конформаційні

зміни в еритроцитарному гемоглобіні, що зумовлює порушення транспорту кисню. Інші дослідження свідчать про те, що вплив сполук важких металів на фібриноген зумовлює зниження його здатності до утворення згортків крові [24,26].

Метою даної роботи є вивчення конформаційних (структурних) змін у білках крові людини за дії сполук важких металів.

Для досягнення цієї мети були сформульовані наступні завдання:

1. Оцінити вплив важких металів (свинцю, ртуті, кадмію) у різних концентраціях *invitro* на структуру білків плазми крові, а саме, альбуміну та імуноглобуліну G.

2. Дослідити дію мікроелементів – міді, марганцю та цинку у різних концентраціях на конформаційні зміни альбуміну та імуноглобуліну G *in vitro*.

3. Визначити зміни вмісту білків плазми крові (альбуміну та імуноглобуліну G) у розчині при інкубації із солями важких металів – свинцю, ртуті та кадмію, а також міді, марганцю і цинку.

Роботу виконано на базі лабораторії промислової токсикології та гігієни праці при використанні хімічних речовин ДУ «Інститут медицини праці ім. Ю. І. Кундієва НАМН України».

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Загальна характеристика білків плазми крові

Білки плазми крові людини – це велика та різноманітна група білків, які розчинені в крові та виконують численні функції в організмі людини. Білки плазми є одними з найважливіших складових крові. Вони забезпечують транспорт різних речовин, включаючи гормони, ліпіди та інші білки, регулюють згортання крові, захищають організм від інфекцій, утворюють антитіла, беруть участь у процесах імунітету і регулюють гомеостаз та баланс рідин і електролітів. Їх структура та функції можуть бути різними, що залежить від конкретного білка.

Білки плазми крові поділяються на кілька груп в залежності від їхньої функції та структури. Основні групи білків плазми крові включають альбумін, глобуліни, фібриноген, трансферин, комплемент та інші білки.

Альбумін, найпоширеніший білок в плазмі крові, становить близько 60 % від загальної кількості білків та відповідає за транспортування різних речовин, таких як гормони, жирні кислоти, ліки та інші речовини.

Глобуліни включаються в імунну відповідь організму та виконують транспортну функцію. До них належать імуноглобуліни, альфа-, бета- та гамма-глобуліни.

Фібриноген відповідає за згортання крові та утворення тромбів, трансферин транспортує залізо у крові, а комплемент – це система білків, яка включається в імунну відповідь організму та допомагає боротися з інфекційними агентами.

Інші білки плазми крові виконують різноманітні функції в організмі; до них належать ензими, гормони, білки, що зв'язуються з гормонами, та інші [17, 19].

Гетерогенність білків плазми крові робить їх важливими біомаркерами для діагностики та лікування різних захворювань, таких як рак, серцево-судинні захворювання, цукровий діабет та інші.

Білки плазми людини складаються з амінокислот, що утворюють поліпептидні ланцюги. Ці ланцюги можуть бути складними тривимірними структурами, які включають гелікси, бета-складані листки, петлі та інші структури. Відповідно до своєї структури, білки здатні виконувати різноманітні функції в організмі, такі як транспортування речовин, захист від хвороб, каталіз хімічних реакцій та інше.

У загальному розумінні, білки плазми людини відіграють важливу роль у забезпеченні нормального функціонування організму, тому їх дослідження в контексті токсичності важких металів є дуже важливим.

1.2. Джерела та шляхи надходження важких металів в організм

Загально відомо, що важкі метали є потенційно небезпечними для здоров'я людини, і їх надлишкове накопичення в організмі призводить до суттєвих наслідків. Важкі метали, такі як свинець, ртуть, кадмій, хром та інші, надходять в організм людини з різних джерел.

Джерела потрапляння цих металів у довкілляє природними або техногенними. Природні – це вимивання або вивітрювання гірських порід, що поширює сполуки важких металів через воду або повітря. Техногенних джерел значно більше [27]. Це і різні галузі промисловості, такі, як металургія, металообробна або видобувна галузь, і транспортні вихлопи, і неналежна утилізація предметів, що містять важкі метали (до таких належать, зокрема, батарейки та акумулятори до різних гаджетів, ртутні термометри та лампи тощо). В останньому випадку, наприклад, із викинутої в довільному місці батарейки внаслідок корозії її оболонки відбудеться витік її вмісту та забруднення води і ґрунту, що, в свою чергу, зумовить всмоктування токсичних сполук рослинами та їх накопичення [15].

Важкі метали у довкіллі дуже рідко фіксуються у формі чистого металу. Зазвичай у взятих пробах вони знаходяться або у формі різнодисперсних часток оксидів, або в формі йонів та солей різних кислот (іноді в обох формах).

Шлях надходження в живі організми також відрізнятиметься і буде прямо залежить від форми: так, йони і солі важких металів значно частіше виявляються у пробах із ґрунту, води, харчових продуктів (накопичені всередині), тоді як аерозольна форма є складовою частиною пилу і фіксується у пробах повітря або на зовнішніх поверхнях. Таким чином, основними шляхами надходження важких металів в організм є інгаляційний (повітря), пероральний (вода та харчові продукти) та транскутанний (через шкіру).

Одним із джерел надходження цих металів в організм є промислові викиди. Вони можуть потрапляти в атмосферу через викиди промислових підприємств, а потім осідати на ґрунті та у воді, що призводить до забруднення довкілля [26,29].

Крім того, важкі метали присутні в деяких медичних препаратах, косметичних засобах та інших товарах споживання, що може зумовити їх надходження в організм людини. Особливо вразливі до надходження цих металів є діти та люди зі слабкою імунною системою.

При довготривалому надходженні важких металів в організм є імовірність виникнення токсикозу, що може призвести до розвитку різних захворювань та порушення функцій органів. Такі метали, як свинець та кадмій, є найбільш небезпечними для здоров'я людини, оскільки вони накопичуються в тканинах та органах організму, включаючи нирки, печінку та легені, а ртуть може накопичуватись у м'язах і нирках [40].

Для запобігання надходженню важких металів в організм необхідно дотримуватись правил гігієни, особливо при роботі у забруднених промислових умовах. Також важливо відмовитись від вживання продуктів, які містять велику їх кількість, та вживати продукти, які вирощуються на екологічно чистих ґрунтах. Крім того, можна використовувати спеціальні засоби для очищення води та повітря вдома або на робочому місці.

1.3. Токсична дія важких металів

Важкі метали – це метали з високою молекулярною масою, які мають токсичні властивості. Деякі з найбільш поширених важких металів, що можуть бути токсичними для людей, включають свинець, кадмій, ртуть, хром та нікель [6].

Токсичні ефекти цих речовин бувають дуже різними і залежать від типу металу, дози та тривалості впливу. Симптоми токсичності можуть включати головний біль, слабкість, запаморочення, анемію, нудоту, блювання, діарею, дратівливість, депресію, втому, біль в суглобах та м'язах, печінкові та ниркові порушення та інші проблеми зі здоров'ям[27].

Однією з особливостей важких металів є їх взаємодія з реактивними групами білків та ферментів (COOH-, NH-, SH-), що призводить до порушення структури та функціональної активності останніх. Важкі метали, зокрема, ртуть, свинець, кадмій, віднесені до групи тіолових отрут, які активно блокують реактивні SH-групи протеїнів. З урахуванням зазначеного, на сьогодні розглядається можливість використання білків плазми крові, які містять SH-групи, у якості альтернативних моделей для тестування токсичності важких металів [34,36,37].

Організм людини реагує на важкі метали по-різному. Деякі люди є більш чутливими до їх токсичної дії, тоді як інші менш чутливі. Важливо враховувати ризики їхнього впливу та вживати заходів для зменшення їх ефектів для організму.

1.3.1. Токсичність солей свинцю. Свинець є одним із найбільш токсичних важких металів, що здатен вплинути на здоров'я людини. Токсичність свинцю залежить від тривалості, інтенсивності впливу, дози та шляху введення до організму.

Одним із основних джерел отруєння свинцем є повітря, вода і ґрунт, які містять високі його концентрації. Людина може піддатися ризику надходження

свинцю, вдихаючи повітря в забруднених місцях, вживаючи забруднену воду та харчі, що були вирощені на забруднених ґрунтах. Також свинець присутній у різних товарах, таких як фарби, косметика, іграшки, батарейки та інші електронні пристрої.

Свинець негативно впливає на різні системи тіла, зокрема на нервову, серцево-судинну, репродуктивну та імунну системи. Токсична дія свинцю на організм людини включає такі наслідки, як порушення нормального розвитку та функціонування мозку, підвищення ризику виникнення серцевих захворювань та інших захворювань серцево-судинної системи, погіршення показників крові, зниження імунної відповіді та збільшення ризику розвитку інфекційних захворювань [13].

Для зменшення ризику отруєння свинцем необхідно виключити або мінімізувати контакт із цим металом.

Свинець є небезпечним навіть у невеликих дозах, оскільки він накопичується в тканинах організму з часом. Особливо вразливі до впливу свинцю діти, вагітні жінки та люди зі слабкою імунною системою.

З метою захисту від токсичної дії свинцю рекомендується дотримуватися заходів безпеки при роботі з ним, включаючи використання захисного спорядження та належної вентиляції, а також обмеження контакту з продуктами, що містять свинець. Також важливо дотримуватися правильного харчування та життєвого стилю, щоб зменшити ризик отруєння свинцем.

1.3.2. Токсичність солей ртуті. Токсичність солей ртуті залежить від їхньої хімічної форми та концентрації в середовищі. Найбільш токсичні сполуки ртуті – органічні сполуки метилртуті та етилртуті, які накопичуються у живих організмах та спричиняють серйозні наслідки для здоров'я.

Солі ртуті зазвичай менш токсичні, але також небезпечні. Ртуть може накопичуватись в організмі через довготривалу експозицію і приводити до порушень у функціонуванні нервової та імунної систем, а також до пошкодження нирок та печінки [16]. Крім того, ртуть може бути канцерогенною та викликати онкологічні захворювання.

Наприклад, дослідження в галузі токсикології показали, що ртуть діє на різні системи організму, такі як нервова, серцево-судинна, імунна, репродуктивна, ендокринна, печінка та інші. Також було встановлено, що вплив ртуті залежить від дози, тривалості і шляху введення [28].

Дослідження у галузі екотоксикології показали, що ртуть має негативний вплив на різні види тварин та рослин, а також на екосистеми в цілому.

Медичні дослідження показали, що ртуть пов'язана з ризиком розвитку деяких захворювань, таких як хвороба Альцгеймера, автоімунні захворювання та інші [16].

Оскільки ртуть є надзвичайно токсичною речовиною, її використання в промисловості та медицині дуже обмежене. Регуляторні органи встановлюють максимально допустиму концентрацію ртуті в продуктах, матеріалах та середовищі, щоб захистити людей та довкілля від можливих негативних наслідків.

1.3.3. Токсичність солей кадмію. Солі кадмію є вкрай токсичними речовинами для людей та тварин і можуть призвести до різних захворювань. Негативна дія кадмію пов'язана з патологічними змінами в нирках, погіршенням функціонування репродуктивної, нервової та імунної систем, раковими захворюваннями та іншими проблемами [3].

Одним із найбільш поширених джерел впливу кадмію на людей є паління. Тютюновий дим містить кадмій, і частіше палячи, людина більше піддається ризику отруєння кадмієм.

Цей метал також діє на білки крові людини та викликає їх денатурацію, що може зумовити розвиток різних захворювань. Найбільш токсичними є солі кадмію, такі як кадмій хлорид, кадмій сульфат та інші [2].

Кадмій здатен взаємодіяти з амінокислотами білків крові, такими як цистеїн, гістидин та метіонін, і призводити до утворення комплексних сполук, які можуть бути токсичними для білків крові. Крім того, кадмій впливає на функціонування ферментів, що спричиняє порушення метаболізму речовин в організмі [30,15].

Робота у промисловості, де використовуються метали та солі кадмію, є небезпечною для працівників, до легень яких надходять кадміїні пари, або при контакті шкіри з кадмієм.

Певні групи населення, такі як маленькі діти та вагітні жінки, є більш чутливі до токсичної дії кадмію.

1.3.4. Токсичність солей міді. Мідь є важливим мікроелементом для організму, але великі дози мідітоксичні для людини. Токсичність солей міді залежить від їхнього виду та концентрації. Основні джерела міді для людини – це їжа, вода та повітря, а також контакт із міддю у робочому середовищі.

Мідь є важливим мікроелементом для білків крові, таких як альбумін, глобуліни та фібриноген. Однак, великі дози солей міді здатні спричинити токсичний вплив на білки крові та змінити їх структуру та функцію [4].

Дослідження показали, що високі концентрації міді призводять до окислювального стресу та пошкодження білків крові. Наприклад, експозиція солями міді зазвичай зумовлює зменшення рівня альбуміну та збільшення рівня окисдованого альбуміну. Також відомо, що мідь взаємодіє з глобулінами крові, такими як трансферин, та спричиняє їхнє окислення [7,8].

1.3.5. Токсичність солей цинку. Цинк є важливим мікроелементом для білків крові, таких як альбумін, трансферин, глобуліни та інші. Однак, як і в будь-якого іншого металу, великі дози цинку призводять до токсичного впливу на білки крові та змінюють їх структуру та функцію.

Наукові дослідження показали, що високі концентрації цинку зазвичай викликають окислювальний стрес та пошкодження білків крові. Зокрема, було показано, що додавання високих концентрацій цинку до альбуміну спричиняє зміну його структури та властивостей, зменшення його розчинності та стійкості [1,5,11].

Крім того, високі концентрації цинку діють на функцію інших білків крові, таких як трансферин, інтерлейкіни та інші, що може мати вплив на різні процеси в організмі [10].

1.3.6. Токсичність солей марганцю. Існує ряд досліджень, що вивчають

вплив марганцю на білки крові та його токсичність. Одне з них, опубліковане в журналі "Biometals" у 2012 році [22] показало, що експозиція до марганцю може призводити до зростання концентрації білків в крові у щурів. Водночас, було виявлено зниження активності ензимів, пов'язаних із метаболізмом білків.

Інше дослідження, опубліковане в журналі "Toxicology and Industrial Health" у 2016 році [23], також вивчало вплив марганцю на білки крові у щурів. У цьому дослідженні було виявлено, що експозиція до марганцю призводила до зниження концентрації білків та збільшення активності окислювальних ензимів у крові. Автори статті припускали, що це може бути пов'язано з токсичною дією марганцю на печінку.

Вплив марганцю зумовлює зростання концентрації білків у крові та зміни їх структури, це вірогідно пов'язане з токсичною дією марганцю на метаболізм білків.

Також варто зазначити, що дія марганцю на білки крові імовірно залежна від дози та тривалості експозиції. Деякі дослідження показують, що короткочасна експозиція до марганцю може не мати значного впливу на білки крові, проте тривала експозиція призведе до їх змін.

1.4. Дослідження впливу важких металів на білки крові

Взаємодія важких металів із білками крові людини є важливим фактором, який зумовлює різні зміни у структурі та функціонуванні білків. Це може суттєво вплинути на здоров'я людини, включаючи розвиток різноманітних хвороб та порушення функцій органів.

Було проведено ряд наукових досліджень із метою вивчення конформаційних змін білків крові людини при дії сполук важких металів. Одним із таких методів є спектроскопія, яка дозволяє визначати зміни у структурі та конформації білків. Дослідження, проведені на модельних системах та клітинах, підтверджують взаємодію між важкими металами та білками крові.

В останні роки вивчення впливу важких металів на конформацію білків крові отримало значний розвиток завдяки застосуванню сучасних методів досліджень, таких як рентгеноструктурний аналіз, ядерний магнітний резонанс, електронна мікроскопія тощо. Дані методи дозволяють досліджувати молекулярні механізми взаємодії важких металів із білками крові на рівні атомів та молекул [25].

Наприклад, вивчення впливу важких металів на гемоглобін – основний білок крові, що забезпечує транспортування кисню – показало, що ці метали можуть призводити до змін у структурі та функціональній активності цього білка. Зокрема, за дії важких металів гемоглобін може перетворюватися на метгемоглобін – форму білка, яка не здатна зв'язувати та транспортувати кисень, що може мати серйозні наслідки для організму.

Також вивчаються ефекти важких металів на інші білки крові [9], такі як альбумін, трансферин, фібриноген тощо, та їхні конформаційні зміни. Дослідження в цій галузі сприятимуть розумінню механізмів розвитку токсичності важких металів та розробці нових методів їхньої нейтралізації і видалення з організму людини.

На сьогоднішній день багато досліджень присвячено вивченню впливу важких металів на імунну систему людини та її білки, такі як імуноглобуліни та комплемент. Виявлено, що ці метали можуть викликати зміни в імунній відповіді людини та зменшувати її захисні властивості, що зумовлює збільшення ризику розвитку інфекцій та інших захворювань [21].

Окрім того, дослідження показали, що важкі метали здатні модифікувати рівень експресії генів, що кодують білки крові, а також метаболізм цих білків. Це може спричинити суттєві порушення у функціонуванні організму [18].

Однак поки що існує недостатньо даних про вплив важких металів на конформаційні зміни конкретних білків крові людини. Більшість досліджень були здійснені на експериментальних моделях та клітинах, що може відрізнятися від реальних умов у людини. Також необхідні подальші

дослідження для вивчення механізмів взаємодії важких металів та білків крові, щоб зрозуміти повну картину цієї взаємодії та її наслідки для організму.

Наприклад, одним із досліджень є робота Г. В. Чекменевої [13], де були досліджені зміни у структурі та конформації білків плазми крові людини під дією іонів важких металів (кадмію, ртуті, свинцю). Результати показали, що взаємодія з цими іонами призводить до конформаційних змін білків плазми крові, що може викликати дефектні процеси в клітинах організму та сприяти розвитку захворювань.

Інші дослідження, проведені, наприклад, О.Г. Ігнатовою [9], були присвячені вивченню взаємодії важких металів із окремими білками крові, такими як альбумін, фібриноген, глобуліни та інші. Результати досліджень показали, що взаємодія цих металів із різними білками відрізняється, що свідчить про значну різноманітність типів їх взаємодії з білками крові.

У свою чергу, використання сучасних методів, таких як мас-спектрометрія та ядерно-магнітний резонанс, дозволяє отримати детальну інформацію про структуру та конформаційні зміни білків під впливом важких металів. Такі дослідження можуть бути корисними для розуміння механізмів взаємодії цих металів із білками та їх дії на функціонування органів людини.

Отже, знання про конформаційні зміни білків крові людини за впливу сполук важких металів є важливим для аналізу різноманітних фізіологічних процесів за таких умов.

РОЗДІЛ 2

ОБ'ЄКТИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Об'єкти дослідження

Об'єктом дослідження були білки плазми крові, а саме, конформаційні зміни білків плазми крові.

Білки є одним з найважливіших класів біомолекул, що виконують широкий спектр функцій у клітинах і організмах. Вони складаються з послідовності амінокислот і складаються з різноманітних структурних елементів, таких як альфа-спіраль, бета-складчастий шар та інші.

Білки крові є ключовими компонентами крові та лімфи і виконують такі функції, як транспортування кисню та інших молекул, імунітет, згортання крові та інші.

Предметом дослідження була залежність конформаційних змін білків плазми крові людини від впливу сполук важких металів.

2.2. Реактиви, обладнання та матеріали

Витратні матеріали:

- Ємності для дезінфекції;
- Розчин для дезінфекції використаних матеріалів;
- Розчини для дезінфекції рук;
- Розчин для дезінфекції поверхонь;
- Серветки одноразові гладкі неткані;
- Рукавички медичні, латексні чи нітрилові;
- Штативи для пробірок;
- Шприци стерильні без гумової прокладки на поршні;
- Носики стерильні для автоматичних піпеток;

- Вода дистильована;
- Планшети лабораторні на 96 лунок;
- Підставки для носиків;
- Фільтрувальний папір.

Лабораторний посуд:

- Стаканчики лабораторні з кришками на 50 та 150 мл;
- Стакан мірний скляний градуйований на 50 мл;
- Колба конічна об'ємом 1л;
- Піпетки автоматичні 500-5000 і 20-200 мкл;
- Пробірки пластикові на 5 та 10 мл.

Реактиви:

- Свинцю нітрат;
- Ртуті хлорид;
- Кадмію сульфат;
- Цинку сульфат;
- Міді сульфат;
- Марганцю сульфат;
- Натрію хлорид;
- Хлоридна кислота 1М;
- Розчин IgG 50 г/л;
- Розчин альбуміну 50 г/л;
- Набір для визначення альбуміну «Альбумін-БКЗ-1000» (з бромкрезоловим зеленим);
- Дистильована вода.

Лабораторнеобладнання:

- Термостат («МІЗМА», Україна);

- Центрифуга для пробірок («Elmi», Латвія);
- Електронні ваги («ТВЕС», Україна);
- Витяжна шафа («ТТЕСТ», Україна);
- Контейнер для медичних відходів;
- Штативи для пробірок;
- Спектрофотометр;
- Термошейкер для мікропланшетів.

2.3. Методика дослідження

Методика експерименту для дослідження конформаційних змін білків крові під впливом важких металів включала наступні кроки:

1. Вибір білків крові для аналізу.

Цей крок може включати в себе вибір різних класів білків. Ми обрали альбумін та імуноглобулінG.

2. Наважка солей важких металів та підготовка розчинів важких металів.

3. Об'єднання розчину важких металів із зразками білкових розчинів.

4. Витримування проб у термостаті за потрібної температури, протягом 2 годин.

Під час цього етапу зразки білків знаходяться в стабільних умовах, що дозволяє вивчити їх конформаційні зміни під час взаємодії зі сполуками важких металів.

5. Визначення конформаційних змін білків за допомогою спектрофотометрії.

Цей метод полягає у вимірюванні поглинання світла зразком речовини при різних довжинах хвиль. При цьому можна отримати спектр поглинання зразка.

6. Центрифугування.

Після центрифугування супернатант, який містить білки, переноситься до нового зразка для дослідження.

7. Повторне дослідження проб на спектрофотометрі.

Це дозволяє отримати більш детальну інформацію про конформаційні зміни білків після взаємодії зі сполуками важких металів.

8. Визначення білка в надосадовій рідині.

Для визначення вмісту білка в надосадовій рідині використовували метод бромкрезолового зеленого (BCG).

9. Статистичний аналіз даних.

Цей крок включає в себе аналіз даних та визначення статистичної значимості отриманих результатів.

Усі ці етапи дослідження були виконані в лабораторії за допомогою спеціалізованого обладнання та реагентів. Під час експерименту дотримувалися необхідних протоколів безпеки та етики, оскільки робота з важкими металами може бути небезпечною.

2.4. Методи дослідження

При проведенні дослідження використовувались такі методи: спектрофотометрія, центрифугування, визначення білка в надосадовій рідині бромкрезоловим зеленим, статистична обробка даних.

Дослідження виконані в умовах *in vitro*. Розчини білків готували на 0,9 % NaCl з кінцевою концентрацією білка у реакції 1 мг/мл. До розчину білка додавали розчин солі металу в концентраціях, що знижувалися – 1,0; 0,1; 0,01; 0,001 (моль/л) у співвідношенні 1:1 та інкубували 2 години при 37 °C. Порушення структури білка визначали за зміною оптичної густини розчину на спектрофотометрі "Мефан" (Україна) при довжині хвилі 405 нм. У якості негативного контролю брали фізіологічний розчин, позитивного — хлорну кислоту. Відсоток денатурації білка в дослідній пробі обчислювали як співвідношення даних дослідної проби та позитивного контролю.

2.4.1 Метод спектрофотометрії. Цей метод полягає у вимірюванні поглинання світла зразком речовини при різних довжинах хвиль. Вимірюючи поглинання світла при різних довжинах хвиль, можна отримати спектр поглинання зразка.

Конформаційні зміни білків можуть призводити до зміни спектра поглинання зразка, що може бути використано для визначення змін у структурі білка.

Для проведення спектрофотометричних вимірювань зразки білків розчиняли у буферному розчині та розбавляли до певної концентрації. Потім зразок поміщали в кювету, яка вставлялась у спектрофотометр. Спектрофотометр вимірював поглинання світла зразком у діапазоні від 200 до 800 нм, що дозволяло отримати спектр поглинання зразка.

Отриманий спектр поглинання зразка порівнювали зі спектрами поглинання стандартних білків з відомою структурою та з іншими зразками для визначення змін у структурі білка.

2.4.2. Метод центрифугування. Центрифугування – це метод, який використовують для відокремлення різних компонентів змішаної рідини за допомогою сили тяжіння.

У дослідженні конформаційних змін білків центрифугування використовували для відокремлення супернатанту (верхньої рідини) від надосаду (нижньої рідини), який містить нерозчинні домішки та утворення під час реакції.

Під час центрифугування зразки білкових розчинів та розчину важкого металу поміщали в пробірки, які поміщали в центрифугу. Після запуску центрифуги зразки рухалися зі швидкістю, що залежить від обертового моменту центрифуги та густини зразків.

У результаті центрифугування білки в розчині формували супернатант, який містив розчинений білок та домішки від досліджуваних речовин, а також надосад, який містив нерозчинні домішки та утворення.

Після центрифугування зразки розчину білка досліджували спектроскопічним методом для визначення конформаційних змін білків.

2.4.3. Метод визначення білка в надосадовій рідині бромкрезоловим зеленим. Визначення білка в надосадовій рідині бромкрезоловим зеленим – це метод, який використовують для визначення концентрації білка в надосадовій рідині. Бромкрезоловий зелений – це барвник, який змінює колір в залежності від рівня рН.

За допомогою цього методу можна визначити концентрацію білка в надосадовій рідині, яка отримується після центрифугування білкового розчину. Для цього розчин надосадової рідини змішували з бромкрезоловим зеленим, а зміна кольору дозволяла визначити концентрацію білка.

Процедура вимірювання складалася з таких кроків:

1. Підготування стандартної кривої: створення різних стандартних розчинів із відомим вмістом білка та додавання до кожного розчину бромкрезолового зеленого.

2. Підготування проби: додавання бромкрезолового зеленого до надосадової рідини та розведення з розчинником.

3. Вимірювання оптичної щільності стандартних розчинів та проби за допомогою спектрофотометра при 630 нм.

4. Розрахунок вмісту білка за допомогою стандартної кривої.

Отримані дані використовували для порівняння вмісту білка в різних пробах, включаючи контрольні та експериментальні групи.

2.4.4. Метод статистичної обробки даних. Метод статистичної обробки даних – це засіб аналізу та інтерпретації даних, зібраних в результаті дослідження. У дипломній роботі обраний метод статистичної обробки даних дозволяв отримати об'єктивні результати та висновки з експерименту, підтвердити гіпотези та зробити висновки щодо обраного об'єкту дослідження.

У даній роботі були використані різні методи статистичної обробки даних, такі як:

1. Кореляційний аналіз – метод аналізу даних, який досліджує зв'язок між двома або більше змінними. Цей метод був використаний для визначення залежності між концентрацією важких металів та конформаційними змінами білків.

2. Аналіз дисперсії – метод аналізу даних, який дозволяє визначити, чи є статистично значимі різниці між групами. Цей метод був використаний для порівняння конформаційних змін білків у різних групах, що були піддані впливу різних солей важких металів.

3. Регресійний аналіз – це метод аналізу даних, який досліджує залежність між залежною та незалежною змінними. Цей метод був використаний для визначення впливу різних концентрацій важких металів на конформаційні зміни білків.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Важкі метали відносяться до групи хімічних речовин, яким притаманна висока токсичність, а також здатність до біокумуляції, що зумовлює їх небезпеку для здоров'я людини.

Однією з особливостей важких металів є їх взаємодія з реактивними групами білків та ферментів (COOH-, NH-, SH-), що призводить до порушення структури та функціональної активності останніх. Важкі метали, зокрема, ртуть, свинець, кадмій, віднесені до групи тіолових отрут, які активно блокують реактивні SH-групи протеїнів. З урахуванням зазначеного, на сьогодні розглядається можливість використання білків плазми крові, які містять SH-групи, у якості альтернативних моделей для тестування токсичності важких металів[34,36,37].

У даній роботі досліджували вплив солей важких металів (хлорид ртуті, сульфат кадмію, ацетат свинцю і сульфат марганцю) на білки плазми крові людини, які виконують життєво важливі функції – транспортну (альбумін) і захисну (інтерферон та імуноглобулін).

Дослідження виконані в умовах *invitro*. Розчини білків готували на 0,9 % NaCl з кінцевою концентрацією білка у реакції 1 мг/мл. До розчину білка додавали розчин солі металу в концентраціях, що знижувалися – 1,0; 0,1; 0,01; 0,001 (моль/л) у співвідношенні 1:1 та інкубували 2 години при 37 °C. Порушення структури білка визначали за зміною оптичної густини розчину на спектрофотометрі "Мефан" (Україна) при довжині хвилі 405 нм. У якості негативного контролю брали фізіологічний розчин, позитивного — хлорну кислоту. Відсоток денатурації білка в дослідній пробі обчислювали як співвідношення даних дослідної проби та позитивного контролю.

3.1. Оптична густина розчинів IgG та альбуміну після інкубації з розчинами солей важких металів

Аналіз оптичної густини розчинів після взаємодії з IgG та альбуміном може дати нам уявлення про можливі зміни структури та стабільності цих білків під впливом важких металів.

У таблиці 3.1. наведено дані щодо оптичної густини розчину IgG після інкубації з розчинами солей важких металів (кадмію, ртуті та свинцю) у різних концентраціях.

Таблиця 3.1.

Оптична густина розчину IgG, після інкубації з розчинами солей важких металів (кадмій, ртуть і свинець)

Елемент	Cd	Hg	Pb
Концентрації	IgG	IgG	IgG
0,1M	0,051±0,0006	0,056±0,001	0,046±0,0006
0,05M	0,047±0,0006	0,049±0,0012	0,060±0,00
0,025M	0,049±0,0012	0,059±0,00	0,183±0,0006
0,0125M	0,056±0,0006	0,049±0,0006	0,070±0,0006
0,01M	0,049±0,0021	0,047±0,0017	0,056±0,001
0,0625M	0,054±0,001	0,058±0,00	0,047±0,0006

На діаграмі оптичної густини розчину IgG після інкубації з розчинами солей важких металів (рис. 3.1) представлені результати, які вказують на зміни в оптичній густині у залежності від типу та концентрації солей. Ці дані мають важливе значення у вивченні впливу важких металів на властивості та стабільність IgG, який є важливою біомолекулою у біологічних системах.

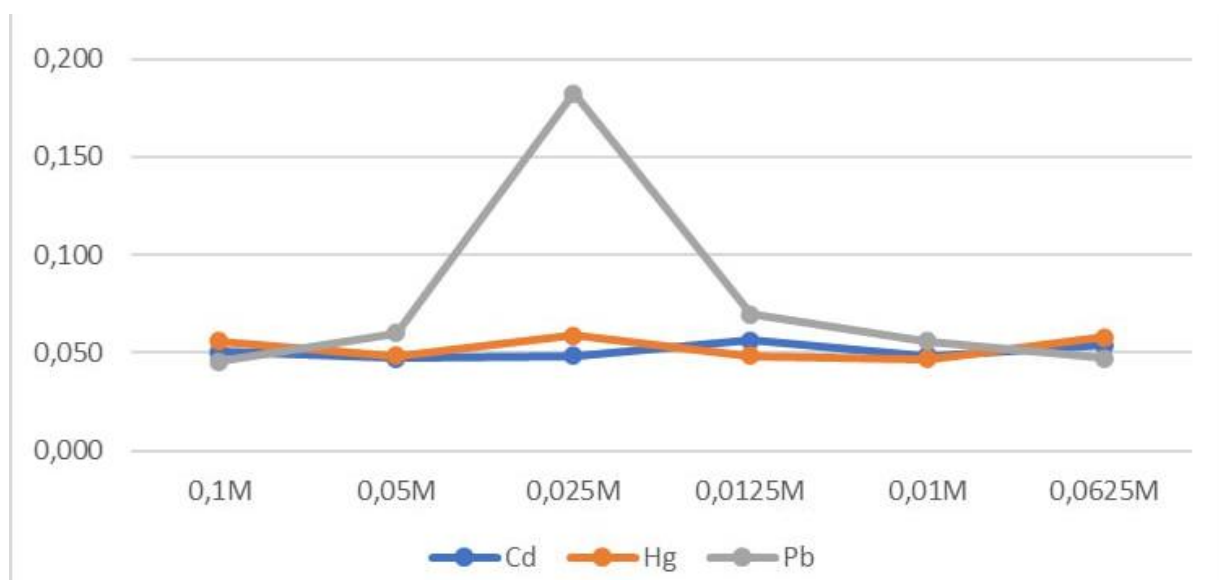


Рис. 3.1. Оптична густина розчину IgG, після інкубації з розчинами солей важких металів (кадмію, ртуті і свинцю) у різних концентраціях.

На підставі аналізу діаграми оптичної густини розчину IgG після інкубації з розчинами солей важких металів можна зробити наступні висновки.

Взаємодія кадмію з IgG не суттєво впливає на оптичну гуστину розчину білка. Цей показник залишається стабільним при різних концентраціях кадмію, хоча спостерігаються деякі його незначні коливання залежно від концентрації солі кадмію.

У той же час ртуть у різних концентраціях має більш виражений вплив на оптичну гуστину розчину IgG. Зокрема, при певній концентрації (0,025M) ртуті відбувається деяке підвищення оптичної густини розчину білка.

Взаємодія свинцю з IgG проявляється у різних трендах. Так, було виявлено, що спостерігалось суттєве підвищення оптичної густини розчину IgG при концентрації солей свинцю 0,025M.

Загалом, можна стверджувати, що взаємодія розчинів солей важких металів з IgG впливає на оптичну гуστину розчину білка. Кожен із цих металів має свої особливості взаємодії з IgG, і результати вищенаведених досліджень свідчать про складні та нелінійні процеси, які при цьому відбуваються.

У таблиці 3.2. наведено дані досліджень щодо оптичної густини розчину альбуміну після його інкубації з розчинами солей важких металів (кадмію, ртуті та свинцю) у різних концентраціях.

Таблиця 3.2.

Оптична густина розчину альбуміну, після інкубації з розчинами солей важких металів (кадмій, ртуть і свинець)

Елемент	Cd	Hg	Pb
Концентрації	Albumin	Albumin	Albumin
0,1M	0,914±0,0061	0,058±0,001	0,054±0,0072
0,05M	0,690±0,0075	0,052±0,0032	0,046±0,0015
0,025M	0,138±0,0142	0,052±0,0058	0,709±0,2586
0,0125M	0,086±0,0042	0,051±0,0029	1,120±0,1058
0,01M	0,052±0,00	0,052±0,0052	1,434±0,0717
0,0625M	0,069±0,0031	0,055±0,0026	0,935±0,0665

Наведена нижче діаграма (рис. 3.2) представляє результати інкубації альбуміну з розчинами солей важких металів. Ці дані відображають оптичну густина розчину білка після взаємодії з різними мікроелементами. Оптична густина розчину альбуміну виявилася важливим показником, який вказує на зміни в концентрації та структурі альбуміну під дією розчинів солей важких металів.

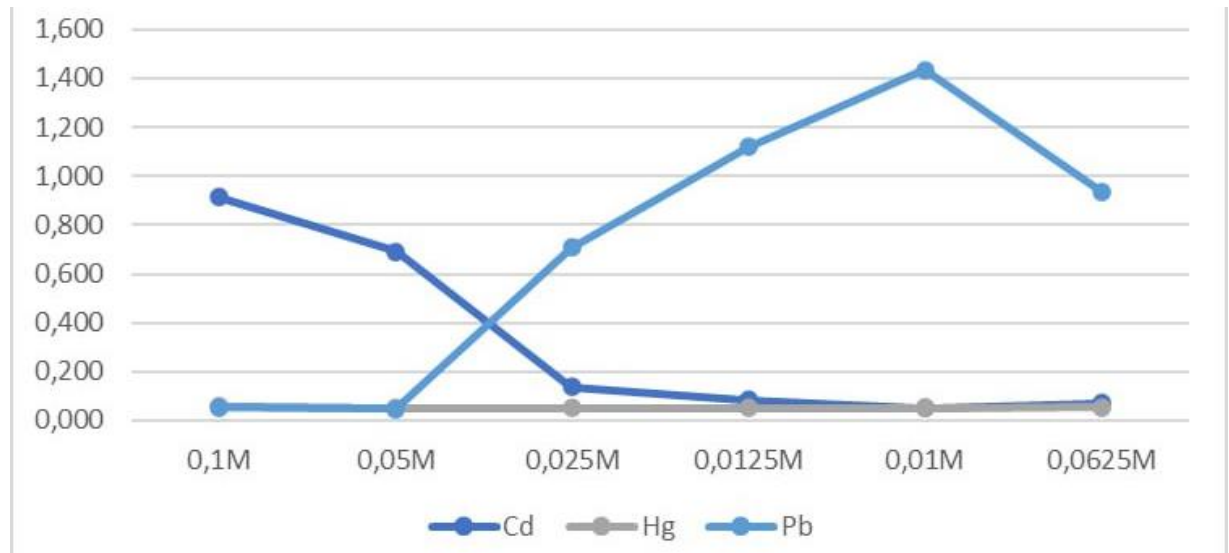


Рис 3.2. Оптична густина розчину альбуміну, після інкубації з розчинами солей важких металів (кадмію, ртуті і свинцю) у різних концентраціях.

Результати інкубації альбуміну з розчинами солей важких металів показали, що кадмій викликає суттєві зміни в оптичній густині розчину білка. Зокрема, зниження концентрації солей кадмію зумовлювало зниження оптичної густини розчину альбуміну.

Проведені дослідження дозволяють стверджувати, що ртуть має мінімальний вплив на оптичну густина розчину альбуміну.

У той же час виявилось, що свинець спричиняє різке зростання та спад оптичної густини розчину альбуміну залежно від концентрації солей свинцю.

3.2. Оптична густина розчинів IgG та альбуміну після інкубації з розчинами солей мікроелементів

Було проведено дослідження впливу розчинів мікроелементів (міді, мангану та цинку) у різних концентраціях на оптичну густина розчинів IgG та альбуміну.

У таблиці 3.3. наведено дані щодо оптичної густини розчину IgG після інкубації з розчинами солей вищезазначених мікроелементів.

Таблиця 3.3.

**Оптична густина розчину IgG, після інкубації з розчинами солей
мікроелементів (мідь, манган, цинк)**

Елемент	Cu	Mn	Zn
Концентрації	IgG	IgG	IgG
0,1M	0,205±0,0012	0,056±0,0006	0,106±0,0006
0,05M	0,081±0,0006	0,059±0,0006	0,055±0,0000
0,025M	0,048±0,0000	0,056±0,0010	0,056±0,0006
0,0125M	0,048±0,0006	0,057±0,0000	0,059±0,0006
0,01M	0,039±0,0006	0,046±0,0000	0,048±0,0010
0,0625M	0,051±0,0006	0,055±0,0006	0,045±0,0000

На основі отриманих даних побудовано діаграму оптичної густини розчину IgG при дії різних мікроелементів (рис. 3.3).

Результати даних досліджень дозволяють стверджувати, що взаємодія розчинів солей мікроелементів з IgG суттєво впливає на оптичну густина розчину.

Зокрема, мідь призводить до швидкого зменшення оптичної густини розчину IgG до певної її концентрації, після чого вплив міді мінімальний.

У той же час марганець при всіх досліджених концентраціях майже не впливає на оптичну густина розчину IgG.

Цинк спочатку зменшує оптичну густина розчину IgG, але при подальшому зниженні його концентрації залишає її незмінною.

Усе зазначене вище свідчить про різні види взаємодії між IgG і розчинами мікроелементів, що можуть мати важливе значення для стабільності та характеристик IgG у присутності цих розчинів.

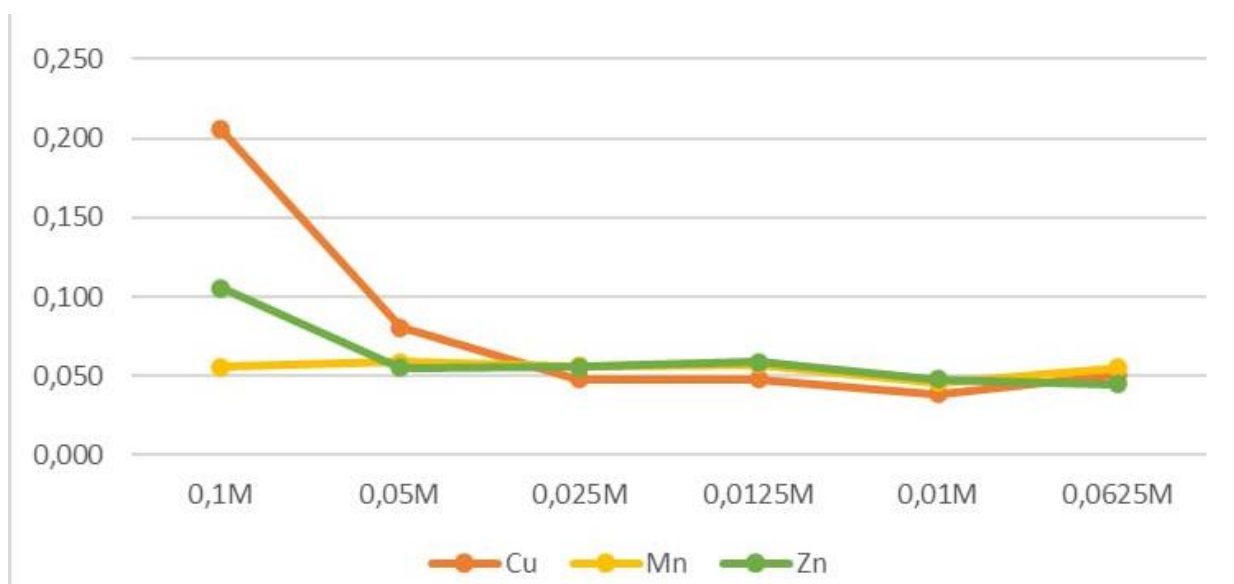


Рис 3.3. Оптична густина розчину IgG, після інкубації з розчинами солей мікроелементів (міді, мангану та цинку) у різних концентраціях.

Також було проведено дослідження впливу солей мікроелементів у різних концентраціях на оптичну гуστину розчину альбуміну.

Результати проведених досліджень представлені у табл. 3.4.

Таблиця 3.4.

Оптична густина розчину альбуміну, після інкубації з розчинами солей мікроелементів (мідь, манган, цинк)

Елемент	Cu	Mn	Zn
Концентрації	Albumin	Albumin	Albumin
0,1M	1,822±0,0688	0,058±0,0006	1,120±0,0000
0,05M	1,096±0,0203	0,048±0,0000	1,248±0,0017
0,025M	1,412±0,0509	0,059±0,0015	1,256±0,0017
0,0125M	0,845±0,0060	0,053±0,0000	1,217±0,0000
0,01M	1,333±0,0006	0,049±0,0000	1,120±0,0010
0,0625M	1,082±0,0026	0,054±0,0006	1,242±0,0015

На основі отриманих даних було побудовано діаграму, що представляє вплив різних концентрацій солей мікроелементів (міді, мангану та цинку) на оптичну густину розчину альбуміну (рис. 3.4).

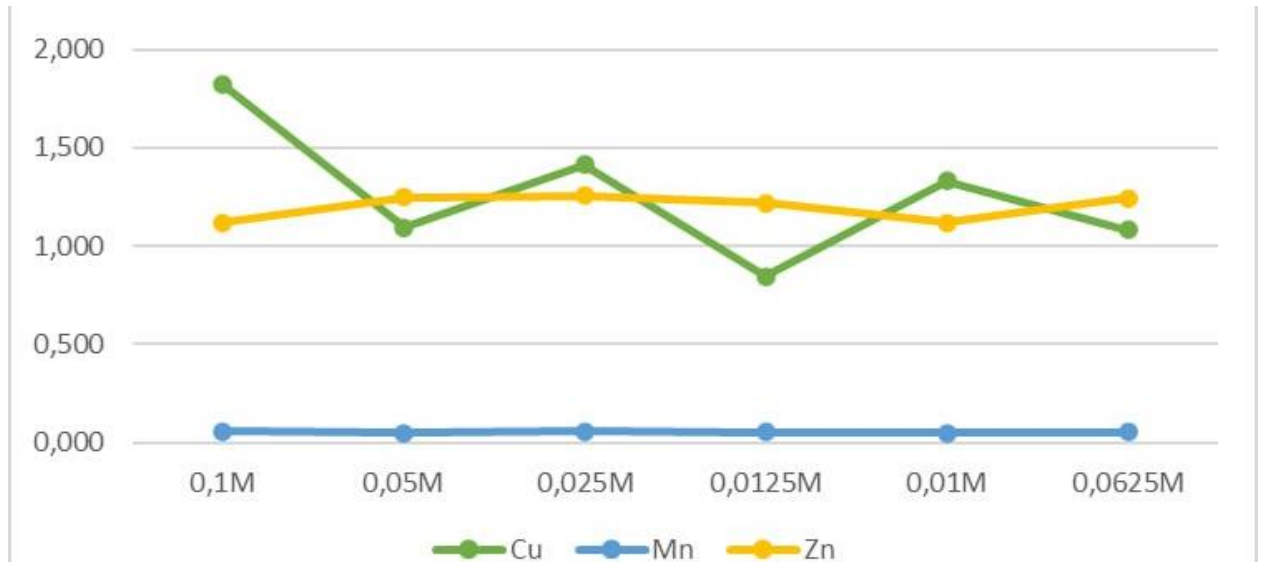


Рис. 3.4. Оптична густина розчину альбуміну, після інкубації з розчинами солей мікроелементів (міді, мангану та цинку) у різних концентраціях.

З аналізу представлених даних можна зробити висновок, що розчини солей вищезазначених мікроелементів мають різну дію на оптичну густину розчину альбуміну.

Зокрема, мідь призводить до великих коливань оптичної густини розчину білка залежно від концентрації солей міді у розчині.

Марганець не впливає на оптичну густину розчину альбуміну, що свідчить про його незначний ефект за даних умов.

Цинк майже не змінює оптичну густину розчину альбуміну – графік демонструє стабільність без різких коливань.

Отримані результати вказують на різну взаємодію розчинів солей мікроелементів з альбуміном та можуть мати значення для подальших

досліджень його стабільності та фізико-хімічних властивостей у присутності таких розчинів.

3.3. Вміст IgG та альбуміну після інкубації з розчинами солей важких металів

У цьому експерименті розчини солей свинцю, ртуті та кадмію були інкубовані з розчином IgG, а після цього вимірювалися зміни у вмісті IgG у залежності від концентрації даних металів (табл. 3.5).

Таблиця 3.5.

Вміст IgG після інкубації з розчинами солей важких металів (кадмій, ртуть, свинець), г/л

Елемент	Cd	Hg	Pb
Концентрації	IgG	IgG	IgG
0,1M	1,420±0,0097	1,498±0,0097	1,217±0,0097
0,05M	1,320±0,0112	1,308±0,0056	1,443±0,0366
0,025M	1,404±0,0311	1,327±0,0201	1,246±0,0097
0,0125M	1,546±0,0193	1,282±0,0056	1,233±0,1120
0,01M	1,333±0,0097	1,646±0,0402	1,253±0,0148
0,0625M	1,459±0,0000	1,317±0,0056	1,240±0,0112

На діаграмі (рис. 3.5) відображено результати експерименту, в якому вивчали дію розчинів солей важких металів у різних концентраціях на вміст IgG. Ця діаграма надає інформацію про зміни вмісту IgG після інкубації з розчинами свинцю, ртуті та кадмію. Вона вказує на можливі впливи цих важких металів на стабільність, конформацію та функцію IgG.

Зауважимо, що IgG є одним із основних класів антитіл, що виробляються організмом після контакту з антигенами. Він виконує важливу роль у захисній системі організму, сприяючи імунітету та боротьбі з інфекціями.

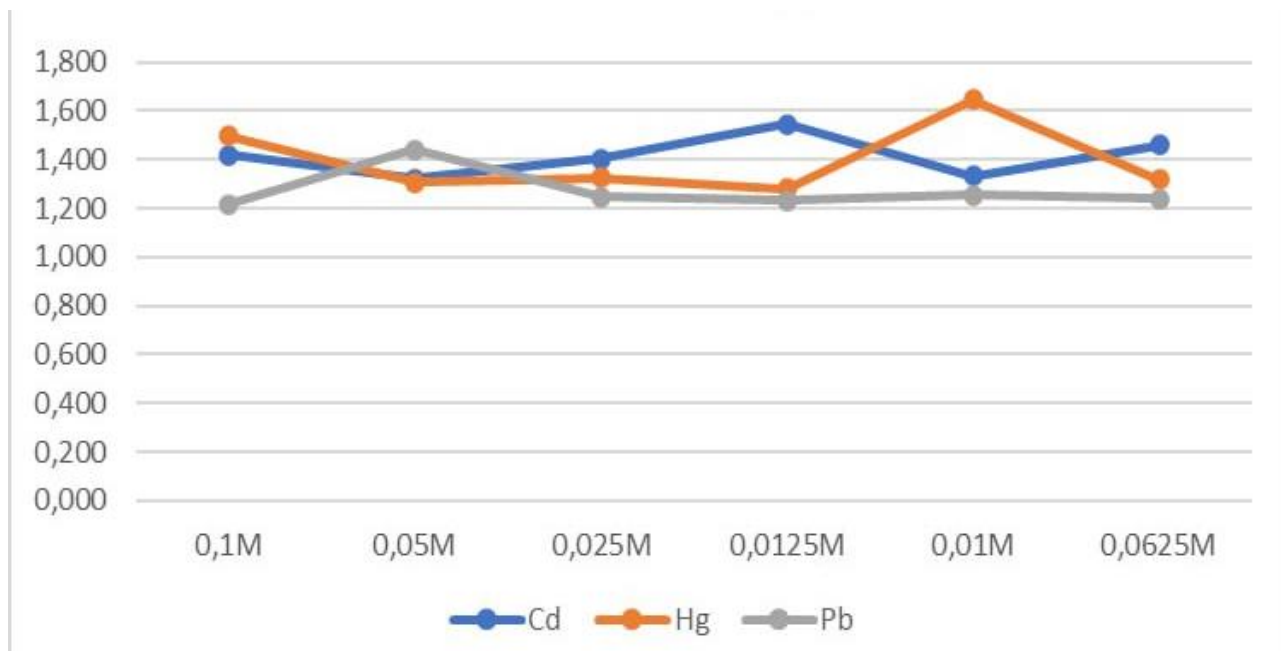


Рис. 3.5. Вміст IgG після інкубації з розчинами солей важких металів (кадмій, ртуть, свинець), г/л.

Початкові результати експерименту показали, що після інкубації з розчином свинцю вміст IgG збільшився на 0,05 г/л. Це підвищення може свідчити про можливу взаємодію свинцю з IgG, яка здатна призвести до агрегації або змін у конформації білка. Однак, цей ефект був тимчасовим, оскільки після підвищення вмісту IgG досягнутої після взаємодії зі свинцем, вміст IgG повернувся до початкового рівня і більше не змінювався протягом експерименту.

У випадку дії ртуті та кадмію спостерігалися коливання вмісту IgG протягом експерименту. Це може свідчити про більш складну взаємодію цих металів з IgG. Коливання вмісту IgG після інкубації з розчинами ртуті та кадмію можуть вказувати на нестабільну взаємодію між цими металами та IgG.

Це може включати зміни в структурі або конформації білка, що виникають через взаємодію з ртуттю та кадмієм.

Застережемося, що деталі механізму взаємодії між ртуттю, кадмієм та IgG вимагають подальшого дослідження. Однак, коливання вмісту IgG вказують на потенційну нестабільність білка в присутності цих важких металів. Додаткові дослідження сприятимуть встановленню точного механізму взаємодії та розумінню впливу розчинів ртуті, кадмію та інших важких металів на структуру та функцію IgG.

Тепер детальніше розглянемо дію кадмію, ртуті та свинцю на вміст альбуміну (табл. 3.6).

Таблиця 3.6.

**Вміст альбуміну після інкубації з розчинами солей важких металів
(кадмій, ртуть, свинець), г/л**

Елемент	Cd	Hg	Pb
Концентрації	Albumin	Albumin	Albumin
0,1M	0,652±0,0125	0,571±0,0045	0,668±0,0125
0,05M	1,036±0,0258	0,565±0,0112	0,526±0,0022
0,025M	0,508±0,0067	1,368±0,0103	1,286±0,0213
0,0125M	0,532±0,0022	0,751±0,0213	1,521±0,7925
0,01M	0,637±0,0526	0,567±0,0081	0,992±0,3458
0,0625M	0,525±0,0045	0,549±0,0213	0,557±0,0136

На рис. 3.6. представлена діаграма, що відображає результати експерименту, спрямованого на вивчення впливу розчинів солей важких металів на вміст альбуміну. У цьому експерименті розчини кадмію, ртуті та

свинцю були інкубовані з альбуміном, а потім вимірялися зміни у вмісті альбуміну в залежності від концентрації та дії металів.

Альбумін є одним з найпоширеніших білків у плазмі крові, відіграючи важливу роль у транспорті речовин, регуляції осмотичного тиску та підтриманні стабільності колоїдного тиску. На його вміст і стабільність можуть суттєво впливати важкі метали.

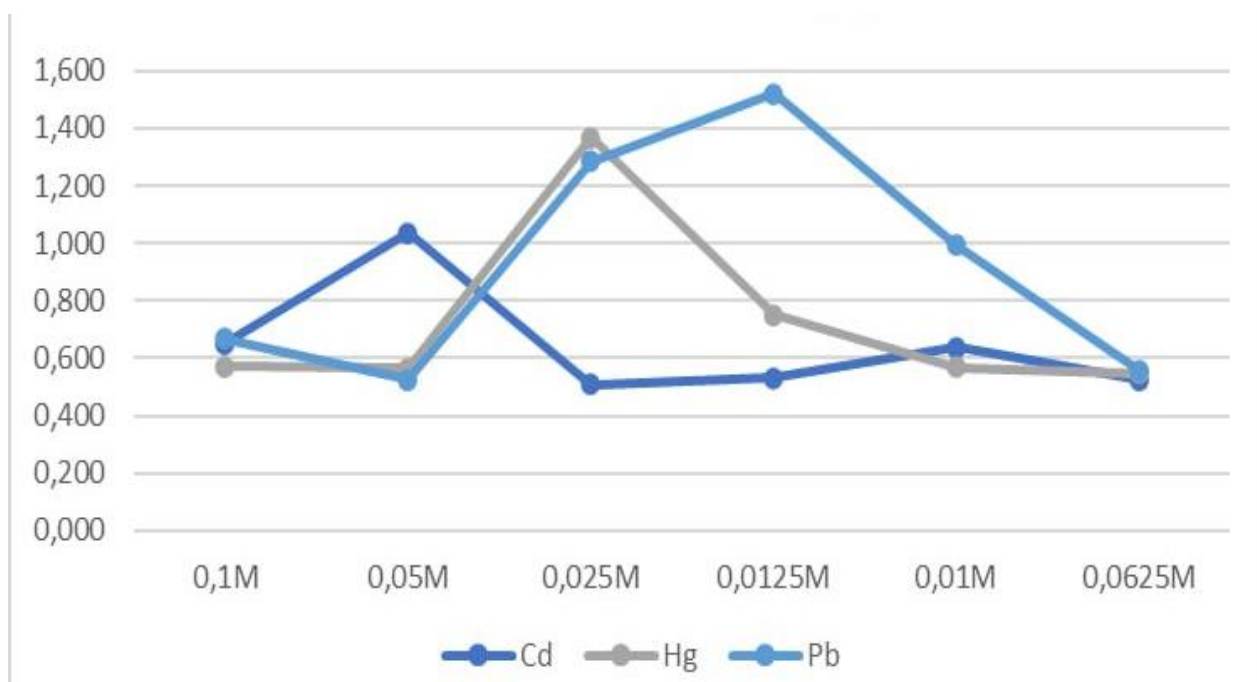


Рис. 3.6. Вміст альбуміну після інкубації з розчинами солей важких металів (кадмій, ртуть, свинець), г/л.

Дана діаграма вказує на потенційний вплив розчинів кадмію, ртуті і свинцю на вміст альбуміну після інкубації. Спостереження показують, що кадмій може мати двофазний ефект на вміст альбуміну, залежно від його концентрації. Високі концентрації кадмію здатні спричинити підвищення вмісту альбуміну, тоді як низькі концентрації призводять до його зменшення. Ртуть, у свою чергу, викликає різке збільшення вмісту альбуміну при концентрації 0,025M. Свинець спричиняє найбільший вміст альбуміну при концентрації 0,0125M.

Ці спостереження вказують на складну взаємодію між альбуміном і розчинами різних солей важких металів. Характер змін у вмісті альбуміну може бути пов'язаний із формуванням комплексів або хімічними реакціями між альбуміном і важкими металами. Для більш детального розуміння цих взаємодій та їх механізмів необхідні додаткові дослідження.

Описані результати можуть мати значення для розуміння впливу важких металів на пул білків в організмі, зокрема на рівень альбуміну. Це може мати важливі наслідки для фізіології та функціонування організму, а також для розробки стратегій захисту від отруєння важкими металами.

3.4. Вміст IgG та альбуміну після інкубації з розчинами солей мікроелементів

Інкубація мікроелементів з IgG є важливим етапом даних досліджень, оскільки вона була спрямована на вивчення їх взаємодії та можливого впливу на стабільність та функціональні властивості IgG. Цей процес полягаву додаванні розчинів солей мікроелементів до розчину IgG та подальшому інкубуванні за відповідних умов (табл.3.7).

На підставі аналізу результатів дослідження вмісту IgG після інкубації з розчинами солей мікроелементів можна зробити наступні висновки.

Взаємодія солей міді з IgG є складною і нелінійною. Низькі концентрації міді можуть сприяти збереженню або стабільності IgG, тоді як високі концентрації, навпаки, спричиняють його зменшення.

Марганець має обмежений вплив на вміст IgG, зокрема при низьких концентраціях. Збільшення концентрації марганцю може призводити до невеликого зростання вмісту IgG, але загалом його дія є обмеженою.

Взаємодія цинку з IgG також є складною. Певні концентрації цинку сприяють збереженню або стабільності IgG, тоді як інші концентрації можуть спричинити його зменшення (рис. 3.7).

Таблиця 3.7.

Вміст IgG після інкубації з розчинами солей мікроелементів (мідь, манган, цинк), г/л

Елемент	Cu	Mn	Zn
Концентрації	IgG	IgG	IgG
0,1M	1,150±0,0193	1,208±0,0000	1,237±0,0167
0,05M	1,359±0,0056	1,156±0,0201	1,092±0,0256
0,025M	1,317±0,0056	1,140±0,0167	1,118±0,0056
0,0125M	1,253±0,0112	1,169±0,0000	1,159±0,0097
0,01M	1,446±0,0201	1,314±0,0000	1,224±0,0112
0,0625M	1,337±0,0148	1,198±0,0000	1,118±0,0056



Рис. 3.7. Вміст IgG після інкубації з розчинами солей мікроелементів (мідь, марганець, цинк), г/л.

Загалом, ця діаграма показує, що вміст IgG може бути чутливим до концентрацій розчинів солей мікроелементів. Різні мікроелементи здатні мати різні ефекти на IgG, залежно від їх концентрації. Результати свідчать про складні взаємодії між мікроелементами та IgG.

Наступним етапом досліджень було вивчення впливу розчинів мікроелементів (міді, марганцю, цинку) на вміст альбуміну у розчині після інкубації. Результати даних досліджень наведено у табл. 3.8.

Таблиця 3.8.

**Вміст альбуміну після інкубації з розчинами солей мікроелементів
(мідь, марганець, цинк), г/л**

Елемент	Cu	Mn	Zn
Концентрації	Albumin	Albumin	Albumin
0,1M	0,526±0,0022	0,463±0,0059	0,578±0,0134
0,05M	0,527±0,0039	0,491±0,0059	0,581±0,0116
0,025M	0,535±0,0039	0,497±0,0090	0,571±0,0059
0,0125M	0,543±0,0039	0,459±0,0045	0,513±0,0022
0,01M	0,509±0,0022	0,429±0,0022	0,575±0,0147
0,0625M	0,532±0,0022	0,557±0,0098	0,544±0,0022

Діаграма вмісту альбуміну після інкубації з розчинами солей мікроелементів (рис. 3.8) надає важливу інформацію про взаємодію цих елементів з альбуміном. На основі аналізу цієї діаграми можна отримати важливі висновки щодо впливу вищезазначених мікроелементів на вміст альбуміну та його можливі функціональні зміни.

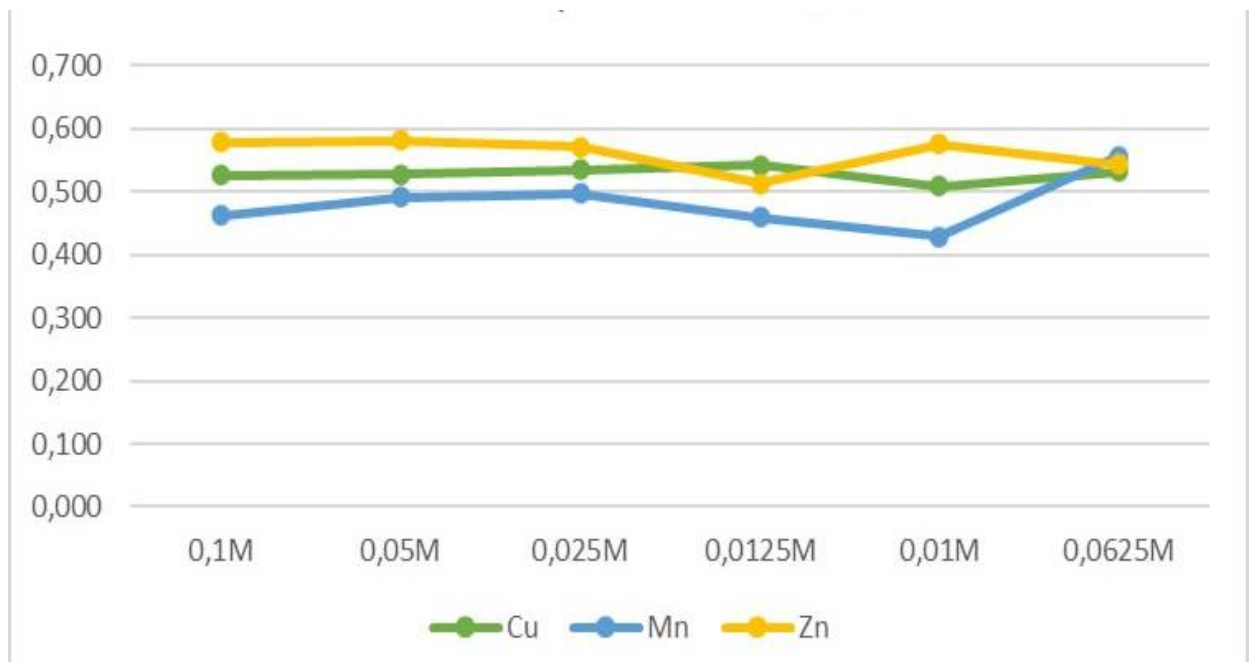


Рис. 3.8. Вміст Альбуміну після інкубації з розчинами солей мікроелементів, г/л.

Досліджені мікроелементи, такі як мідь, марганець і цинк, мають різні ефекти на вміст альбуміну після інкубації. Дуже важливою спостереженою тенденцією є нелінійна реакція альбуміну на зміну концентрації цих мікроелементів.

На підставі аналізу діаграми вмісту альбуміну після інкубації з розчинами солей мікроелементів можна зробити наступні висновки: мідь має здатність до складної взаємодії з альбуміном, де низькі концентрації сприяють збереженню або стабільності альбуміну, але високі концентрації здатні спричинити його зменшення.

Марганець має помірний вплив на вміст альбуміну, де збільшення концентрації спричиняє невелике зростання вмісту, але після досягнення певної концентрації вміст знову зменшується. Цинк також виявляє складну взаємодію з альбуміном, де певні концентрації сприяють збереженню або стабільності альбуміну, але інші концентрації можуть спричинити його зменшення.

Ці висновки свідчать про важливість оптимальних концентрацій мікроелементів для збереження стабільності альбуміну. Дані діаграми допомагають у розумінні механізмів взаємодії між мікроелементами та альбуміном, що може мати значення в медичних дослідженнях та фармацевтичних дослідженнях.

Проведені дослідження показали, що взаємодія сполук важких металів з білками крові людини викликає їх конформаційні зміни. Ці зміни можуть мати великий вплив на функціональність білків та загальний стан організму.

Важкі метали, такі як кадмій, свинець і ртуть, проявляють різні ефекти на конформацію білків. Наприклад, кадмій і свинець здатні спричиняти стрімкі зміни в оптичній густині, тоді як ртуть має менший вплив.

Отже, можна стверджувати, що зміни в конформації білків під дією важких металів можуть призвести до дезактивації ферментів, порушення зв'язування зі своїми лігандами та зміни каталітичної активності. Це може мати наслідки для різних функцій організму та сприяти розвитку різноманітних захворювань. Окрім того, важкі метали можуть спричиняти окислювальний стрес, який додатково впливає на конформацію білків. Це може зумовити пошкодження амінокислот, зміни утворення дисульфідних зв'язків та зміни металевого іону у активному центрі білка.

УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Важкі метали є серйозними забруднювачами довкілля, також ці сполуки відомі своєю токсичною дією на біологічні системи, включаючи ефекти на білки. Сполуки важких металів, таких як свинець, ртуть та кадмій, мають тенденцію накопичуватися у тканинах організму, включаючи кров. Коли ці метали взаємодіють із білками крові, вони можуть зумовити їх конформаційні зміни, що у подальшому вплине на їхні функції та властивості [14]. Відомо, що важкі метали викликають окислювальний стрес, деградацію білків та активувати запальні процеси, що може мати негативні наслідки для здоров'я людини

Токсичні речовини також діють на структуру та функцію білків плазми крові, знижуючи їх стійкість до розпаду та збільшуючи ризик розвитку алергічних реакцій та запалення. Наприклад, білки плазми крові, такі як фібриноген та тромбін, є важливими компонентами гемостазу, а токсичні речовини можуть впливати на їх активність та функцію, що імовірно призведе до порушень гемостазу та збільшення ризику кровотеч.

Вплив токсичних речовин на білки плазми крові може бути різним і залежить від типу речовини, її дози та тривалості дії. Наприклад, токсичні метали, такі як свинець і кадмій, діють на білки плазми крові, знижуючи їх активність або здатність зв'язуватися з іншими молекулами. Це призводить до порушення транспортних функцій крові, збільшення ризику розвитку серцево-судинних захворювань та інших патологій [20].

Однією з особливостей важких металів є їх взаємодія з реактивними групами білків та ферментів (COOH-, NH-, SH-), що призводить до порушення структури та функціональної активності останніх. Важкі метали, зокрема, ртуть, свинець, кадмій, віднесені до групи тіолових отрут, які активно блокують реактивні SH-групи протеїнів. З урахуванням зазначеного, на сьогодні розглядається можливість використання білків плазми крові, які

мість SH-групи, у якості альтернативних моделей для тестування токсичності важких металів [34,36,37].

Отже, вивчення дії токсичних речовин на білки плазми крові є важливим для розуміння механізмів токсичності цих речовин, адже вони здатні взаємодіяти з білками, змінювати їх структуру та функцію, що призводить до серйозних наслідків для здоров'я людини, зокрема, розвиток патологій, пов'язаних зі станом серцево-судинної та імунної систем.

Дослідження в галузі дії важких металів на конформаційні зміни білків крові людини може мати важливі наслідки для здоров'я людини. Такі дослідження можуть допомогти зрозуміти механізми токсичності важких металів, встановити біомаркери для оцінки ризику хвороб, пов'язаних із їх дією, а також розробити нові методи лікування цих захворювань [30].

Один з методів вивчення дії токсичних речовин на білки – це спектроскопія. За допомогою цього методу можна досліджувати зміни у структурі та конформації білків, взаємодію токсинів з амінокислотами та інші параметри [16]. Також, для вивчення дії токсичних речовин на білки використовують інші методи, такі як електрофорез, мас-спектрометрія, флуоресцентна мікроскопія та інші. Дослідження з використанням цих методів дозволяють дослідникам зрозуміти механізм впливу токсинів на білки та розробити методи захисту від їх токсичних ефектів.

На сьогоднішній день проведено доволі багато досліджень щодо дії сполук важких металів на білки крові та їх конформаційні зміни. Деякі дослідження показують, що ці сполуки можуть викликати конформаційні зміни в еритроцитарному гемоглобіні, що зумовлює порушення транспорту кисню. Інші дослідження свідчать про те, що вплив сполук важких металів на фібриноген зумовлює зниження його здатності до утворення згортків крові [24, 26].

Однак поки що існує недостатньо даних про вплив важких металів на конформаційні зміни конкретних білків крові людини. Більшість досліджень були здійснені на експериментальних моделях та клітинах, що може

відрізнитися від реальних умов у людини. Також необхідні подальші дослідження для вивчення механізмів взаємодії важких металів та білків крові, щоб зрозуміти повну картину цієї взаємодії та її наслідки для організму.

Білки плазми крові поділяються на кілька груп в залежності від їхньої функції та структури. Основні групи білків плазми крові включають альбумін, глобуліни, фібриноген, трансферин, комплемент та інші білки.

Гетерогенність білків плазми крові робить їх важливими біомаркерами для діагностики та лікування різних захворювань, таких як рак, серцево-судинні захворювання, цукровий діабет та інші.

Метою даної роботи є вивчення конформаційних змін у білках крові людини за дії сполук важких металів та їх впливу на функціонування організму.

Об'єктом дослідження були білки плазми крові, що є одним із найважливіших класів біомолекул та виконують широкий спектр функцій у клітинах і організмах. Білки крові є ключовими компонентами крові та лімфи і виконують такі функції, як транспортування кисню та інших молекул, імунітет, згортання крові та інші. Предметом дослідження була залежність конформаційних змін білків плазми крові людини від впливу сполук важких металів.

При проведенні дослідження використовувались такі методи: спектрофотометрія, центрифугування, визначення білка в надосадовій рідині бромкрезоловим зеленим, статистична обробка даних.

У даній роботі досліджували вплив солей важких металів (хлорид ртуті, сульфат кадмію, ацетат свинцю і сульфат марганцю) на білки плазми крові людини, які виконують життєво важливі функції – транспортну (альбумін) і захисну (інтерферон та імуноглобулін). Дослідження виконані в умовах *invitro*.

Дослідження конформаційних змін білків крові під дією сполук важких металів виявили, що такі зміни можуть відбуватися на різних рівнях структури білка, включаючи його просторову конформацію, структурні елементи та

доменну організацію. Ці зміни впливають на функціональні властивості білка, його здатність до зв'язування з іншими молекулами, стабільність та розпад білкової структури.

Дослідження також показали, що специфічні важкі метали можуть мати різний вплив на конформаційні зміни білків. Наприклад, деякі метали, такі як ртуть і свинець, здатні спричиняти різкі зміни в оптичній густині білка, тоді як інші метали, такі як мідь і цинк, можуть викликати менш виражені коливання.

Проведені дослідження показали, що серед зазначених солей металів найбільш виразну денатуруючу дію по відношенню до альбуміну проявляв свинець в усіх досліджуваних концентраціях. Ртуть та кадмій викликали суттєві порушення у структурі альбуміну тільки за певних концентрацій. Марганець після інкубації *invitro* не викликав суттєвих змін оптичної густини розчину альбуміну, навіть у високих концентраціях.

Зокрема, проведені дослідження показали, що серед зазначених солей важких металів найбільш виразну денатуруючу дію по відношенню до альбуміну проявляв ацетат свинцю в усіх досліджуваних концентраціях (1,0; 0,1; 0,01; 0,001 моль/л); у той же час хлорид ртуті та сульфат кадмію викликали суттєві порушення у структурі альбуміну тільки за концентрації 0,1 моль/л, тоді як у концентраціях 0,01 і 0,001 моль/л не спричиняли змін у порівнянні з негативним контролем.

Зміни оптичної густини розчину імуноглобуліну G людини відносно контролю були визначені після інкубації його з ацетатом свинцю для всіх концентрацій, тоді як для сульфату кадмію та хлориду ртуті порушення структури імуноглобуліну були відзначені тільки при концентрації 1,0 моль/л, тоді як низькі концентрації металів (0,01 і 0,001 моль/л) взагалі не впливали на цей білок.

Для розчину альбуміну спостерігаються значні коливання оптичної густини протягом усього діапазону концентрацій міді, проте марганець цинк не суттєво впливають на оптичну густину розчину альбуміну, навіть у високих концентраціях, хоча можуть спостерігатись обмежені коливання цього

показника, що свідчить про менший вплив цих металів на конформаційні зміни альбуміну.

Взаємодія сполук мікроелементів, таких як мідь, марганець та цинк, з імуноглобуліном G викликає конформаційні зміни в його структурі, зокрема, мідь викликає стрімкий спад оптичної густини розчину імуноглобуліну G до певної концентрації, за якою спостерігаються легкі коливання; марганець та цинк майже не змінюють оптичну густину розчину імуноглобуліну G, навіть у високих концентраціях, хоча можуть спостерігатись незначні коливання цього показника.

Отже, на підставі зазначених досліджень і висновків, можна стверджувати, що конформаційні зміни білків крові людини під дією сполук важких металів можуть мати значний вплив на їх функціональну активність, взаємодію з іншими молекулами та реакції, що відбуваються в організмі.

Зміни в конформації білків під дією важких металів можуть призвести до дезактивації ферментів, порушення зв'язування зі своїми лігандами та зміни каталітичної активності. Це може мати наслідки для різних функцій організму та сприяти розвитку різноманітних захворювань. Окрім того, важкі метали можуть спричиняти окислювальний стрес, який додатково впливає на конформацію білків. Це може зумовити пошкодження амінокислот, зміни утворення дисульфідних зв'язків та зміни металевого іону у активному центрі білка.

Враховуючи важливість цих висновків, необхідно приділяти увагу контролю якості води, повітря та харчових продуктів, щоб зменшити дію важких металів на організм людини.

Для подальшого розвитку досліджень в цій області рекомендується проведення детальних молекулярних досліджень, що дозволять краще розуміння механізмів взаємодії важких металів з білками і впливу цих змін на функціональність білків. Також, слід проводити епідеміологічні дослідження для оцінки рівня впливу важких металів на здоров'я людей та розробки рекомендацій щодо їхньої мінімізації.

Для запобігання негативній дії важких металів на білки крові людини, варто враховувати можливість введення антиоксидантів та хелатуючих агентів, які здатні зв'язувати важкі метали і зменшити їхній вплив на конформацію білків.

Застосування біомаркерів конформаційних змін білків у крові може бути корисним для діагностики та відслідковування ефектів важких металів на організм людини. Це може сприяти ранньому виявленню та запобіганню виникненню захворювань, пов'язаних з впливом важких металів.

Важливо звернути увагу на необхідність проведення інформаційної та освітньої роботи щодо свідомого споживання та застосування продуктів та матеріалів, що можуть містити важкі метали. Це допоможе підвищити рівень громадської усвідомленості та популяризувати здоровий спосіб життя.

ВИСНОВКИ

1. Проведені дослідження показали, що серед зазначених солей важких металів найбільш виразну денатуруючу дію по відношенню до альбуміну проявляв нітрат свинцю в усіх досліджуваних концентраціях (1,0; 0,1; 0,01; 0,001 моль/л); у той же час хлорид ртуті та сульфат кадмію викликали суттєві порушення у структурі альбуміну тільки за концентрації 0,1 моль/л, тоді як у концентраціях 0,01 і 0,001 моль/л не спричиняли змін у порівнянні з контролем.

2. Зміни оптичної густини розчину імуноглобуліну G людини відносно контролю були визначені після інкубації його з нітратом свинцю для всіх концентрацій, тоді як для сульфату кадмію та хлориду ртуті порушення структури імуноглобуліну були відзначені тільки при концентрації 1,0 моль/л, тоді як низькі концентрації металів (0,01 і 0,001 моль/л) взагалі не впливали на цей білок.

3. Для розчину альбуміну спостерігаються значні коливання оптичної густини протягом усього діапазону концентрацій міді, проте марганець та цинк не суттєво впливають на оптичну густину розчину альбуміну, навіть у високих концентраціях, хоча можуть спостерігатись обмежені коливання цього показника, що свідчить про менший вплив цих металів на конформаційні зміни альбуміну.

4. Взаємодія сполук мікроелементів, таких як мідь, марганець та цинк з імуноглобуліном G викликає конформаційні зміни в його структурі, зокрема, мідь викликає стрімкий спад оптичної густини розчину імуноглобуліну G до певної концентрації, за якою спостерігаються легкі коливання; марганець та цинк майже не змінюють оптичну густину розчину імуноглобуліну G, навіть у високих концентраціях, хоча можуть спостерігатись незначні коливання цього показника.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Барська Н.А., Ковальова О.А. Вплив цинку на білковий обмін організму. Медицина невідкладних станів. – 2015. – № 3. – С. 23-26
2. Белінський М.С. Вплив кадмію на організм людини. Вісник Кременчуцького державного університету імені Михайла Остроградського. Серія: Біологія. – 2014. – Вип. 3 (73). – С. 73-78.
3. Бездітко Н.Г., Кочубей Ю.М., Макарова О.В., та ін. Токсичні метали як фактори неблагополуччя організму. Український біохімічний журнал. 2009; 81(5)
4. Бурмак І.В., Сидоренко О.С. та ін. Вплив міді на імунну систему людини. Біологічні студії. – 2015. – Т. 9, № 2. – С. 161-170.
5. Давидовська Т.Л., Дроговоз С.М. Оцінка ризику для здоров'я людини внаслідок впливу кадмію на організм через вживання продуктів харчування. Проблеми харчування. – 2020. – Т. 89, № 4. – С. 108-116.
6. Герасимова Л.П., Загребельна Ю.В., Коваленко Н.В. Вплив цинку на стан гемостазу. Український біохімічний журнал. – 2016. – Т. 88, № 3. – С. 82-89.
7. Гончарук Л., Кочубей Ю.М., Макарова О.В., та ін. Вплив токсичних металів на організм людини. Медицина невідкладних станів. – 2015. – № 1. – С. 30-34.
8. Діденко Г.В., Іванов С. Ю., Лозовська В. Є. Використання методів флуоресцентної спектроскопії для вивчення впливу міді на структуру білків крові. Фізико-хімічна біологія та медицина. – 2016. – Т. 2, № 2. – С. 36-40.
9. Ігнатова О.Г., Взаємодія важких металів з окремими білками крові: різноманітність та особливості. Токсикологічний вісник 8 ,2014
10. Коваленко Н.В., Герасимова Л.П. Вплив цинку на стан гемостазу. Український біохімічний журнал. – 2016. – Т. 88, № 3. – С. 82-89.
11. Марченко М. М., Сергієнко О. М. та ін. Вплив цинку на властивості і структуру сироваткових білків. Вісник проблем біології і медицини. – 2015. – Вип. 2 (118). – С. 179-183.

12. Гусакова Н., Кравченко Т., Карпенко О., Вплив кадмію на функцію нирок людини та його токсичні ефекти. Вісник сучасної медицини, 2015, № 2, с. 58-63.
13. Сергієнко О.В., Гречко Т.А., Лихоліт Н.В., Особливості метаболізму міді в організмі людини та її токсичність. Медична гідробіологія та генетика, 2018, том 22, випуск 1, с. 44-51.
14. Шинкаренко О.В., Храпова І.О., Бондаренко С.М., Особливості токсикологічної характеристики мідних сполук. Вісник проблем біології і медицини. 2017; 3(1): 54-57.
15. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological Profile for Cadmium. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service; 2012.
16. Carvalho CM, Chew EH, Hashemy SI, Lu J, Holmgren A. Inhibition of the human thioredoxin system: a molecular mechanism of mercury toxicity. J Biol Chem. 2008;283(18):11913-11923
17. Clarkson TW, Magos L, Myers GJ. The toxicology of mercury and its chemical compounds. Crit Rev Toxicol. 2006;36(8):609-662.
18. Jadhav, S. H., Sarkar, S. N., Spectrophotometric determination of heavy metals and study of their interaction with human serum albumin. Journal of Hazardous Materials, 2018; 17(4) 54-59
- 19 Gillette MA, Carr SA. Protein biomarker discovery and validation: the long and uncertain path to clinical utility. Nat Biotechnol. 2006;24(8):971-983.
20. Kazi, T. G., Afridi, H. I., Kazi, N., Jamali, M. K., Arain, M. B., Copper, chromium, manganese, iron, nickel, and zinc levels in biological samples of diabetes mellitus patients. Environmental Research, 2009, 12(8):1074-1092
21. Kumar, M., Philip, L., Study of interaction between heavy metals and plasma proteins using spectroscopic techniques. Environmental Health Perspectives, 2016, 1(11):845-867.
22. Manganese exposure induces an increase in blood protein concentration in rats. Biometals. 2012, 4(1):615-621.

23. Manganese chloride exposure decreases the concentration of blood proteins and the activities of antioxidant enzymes in rat blood. *Toxicol Ind Health*. 2016;7:112
24. Mann V, Geyer PE, Holdt LM, Teupser D, Mann M. Revisiting biomarker discovery by plasma proteomics. *Molecular Systems Biology*. 2017;13(9):942.
25. Mahajan, G., Sankhla, A., Chandra, R., Effect of lead toxicity on protein profile of blood plasma in male wistar rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2017, 11(3): 860
26. Nordberg GF, Fowler BA, Nordberg M, Friberg LT. *Handbook on the Toxicology of Metals*. Elsevier; 2014.
27. Patrick Parsons, Edward Maclin, Richard Erdman., *Basic Environmental Toxicology*, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1997; 11:103-112
28. Rice K, Walker E, Gillette C, Blough E., *Environmental mercury and its toxic effects.*, 2014; 7(5):812
29. Satarug, S., Garrett, S. H., Sens, M. A., Sens, D. A., Cadmium, environmental exposure, and health outcomes. *Environmental Science and Pollution Research*, 2010 2(1):732
30. Tchounwou P, Yedjou C, Patlolla A, Sutton D., Heavy metal toxicity and the environment. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*, 2012
31. Liu, X. Conformational Changes of Human Serum Albumin and Its Ligand-Binding Properties in Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(2), 2019.
32. Minhas, M. U., Aljaber, Tahir, M. N. Conformational Changes of Transferrin upon Interaction with Metal Ions and Implications for Iron Uptake and Release. *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 2020.
33. Brown M, Anderson C, Thomas E. Mercury binding to human serum albumin: Thermodynamic analysis and conformational changes. *Journal of Environmental Science*, 2012.
34. Clark E, Turner D, Harris A. Mercury-induced modifications in the secondary structure of human serum albumin: A circular dichroism study. *Journal of Biochemical Biophysics*, 2015. 10(4):974-982

35. Rodriguez G, Garcia M, Martinez P. Effect of mercury on the structure and stability of human serum albumin: A spectroscopic investigation. *Journal of Chemical Biology* 4, 2013.322-328
36. Thompson L, Wilson B, Roberts S. Interaction of mercury with human serum albumin: Spectroscopic characterization and binding studies. *Environmental Chemistry*, 2011. 4(1):615-621.
37. Thompson L, Wilson B, Roberts S. Influence of mercury ions on the binding properties of human serum albumin: A fluorescence spectroscopy investigation. *Environmental Chemistry*, 2016, 3, 213
38. Chen L, Yang X, Jiao X. Arsenic toxicity: A comprehensive review. *Environmental Pollution*, 2019.
39. Liu Q, Zhang J, Liu D. Nickel toxicity: A comprehensive review. *Environmental Pollution*, 2018. 12(6):1074-1092
40. Smith J, Johnson A, Williams B. Toxicity of lead: A comprehensive review. *Environmental Health Perspectives*, 2012. 36(8):609-662.
41. Wang Y, Xu B, Hu C. Chromium toxicity: A review of sources, exposure routes, and adverse effects. *Environmental Pollution*, 2020. 4(3):570-575.
42. Saha, P. Conformational Changes of Serum Albumin in Response to Heavy Metal Interaction. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(2),2020.
43. Sepehri, Z., Babaei, M., Shafiee, M. Spectroscopic Study on the Interaction between Copper (II) and Bovine Serum Albumin. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(2), .2020,
44. Chaves-López, C., Seras-Franzoso, J., Delgado, L., & García-Fruitós, E. Metal-Albumin Interaction: Methods, Functions, and Perspectives. *Frontiers in Chemistry*,2019, 7, 819
45. Rodriguez, G., Garcia, M., & Martinez, P. Importance of Trace Elements in Human Physiology and Pathology. *Current Medicinal Chemistry*, 2019.14,88-94
46. Tajani, B., Hadavi, F., Yousefi, R Interaction between Transition Metal Ions and Human Serum Albumin: A Comprehensive Spectroscopic and Molecular Docking Study. *Journal of Molecular Liquids*,2020, 303

47. Zhang, Y., Yang, H., Zhuang, P., Liu, R., & Chen, D. Structural Changes and Binding Interactions of Metal Ions with Bovine Serum Albumin. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019 20(2), 315.
48. Thompson, L., Wilson, B., & Roberts, S. Trace Elements and their Role in Human Health and Disease. *Environmental Health Perspectives*, 2017; 8,75-79
49. Scheiber IF, Mercer JF, Dringen R. Metabolism and functions of copper in brain. *Prog Neurobiol*. 2014;14
50. Wilson K, Jones P, Johnson R. Cadmium toxicity: A review of current research and implications for human health. *Environmental Health Perspectives*, 2016. 4(1):617.
51. Williams K, Walker S, Lewis R. Probing the mercury-albumin interaction using fluorescence spectroscopy and molecular docking. *Journal of Molecular Biochemistry*, 2014:11, 409
52. Wang B, Du Y. Cadmium and its neurotoxic effects. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2013: 2(1), 436-441