

УДК (546.815/819:54.022):612.115.001.4

© Колектив авторів, 2012.

ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ МІКРО- І НАНОЧАСТИНОК СВИНЦЮ НА БІЛКИ СИСТЕМИ ЗГОРТАННЯ КРОВІ В УМОВАХ IN VITRO

¹I.В.Губар, ²О.С.Ільчук, ²С.І.Куповська, ²К.П.Осипенко

¹Лабораторія промислової токсикології і гігієни праці при використанні хімічних речовин (зав. лабораторією акад. АМН України І.М.Трахтенберг. ДУ «Інститут медицини праці АМН України»;

²Лабораторія біохімії. Національний інститут хірургії та трансплантології ім. О.О.Шалімова АМН України, м. Київ.

EXPERIMENTAL IN VITRO STUDY OF LEAD MICRO- AND NANOPARTICLES EXPOSURE ON PROTEINS OF BLOOD COAGULATION SYSTEM

I.V. Gubar, O.S. Ilchuk, S.I Kupovska, K.P. Osipenko

SUMMARY

The article presents the results of experimental studies of in vitro exposure of lead micro- (3,3-4,5) mkm and nanoparticles (6-10, 26-34 and 50-80) nm in concentrations (10^{-3} - 10^{-7}) mol/l on fibrinogen, thrombin, thromboplastin. Toxicity of lead particles was measured by their ability when incubated with a solution of protein to cause its denaturation, thus changing the optical density of the solution. It was established that the decrease in size of lead particles increased their toxic effects on the coagulation system proteins. At lower concentrations lead micro- and nanoparticles denaturing effect also reduced in the incubation medium. The sensitivity of proteins to the lead particles of all sizes found in the following sequence: thrombin> fibrinogen> thromboplastin. Revealed conformational changes may be due to the influence of lead micro- and nanoparticles on the structure and activity of proteins that take part in blood coagulation process.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ МИКРО- И НАНОЧАСТИЦ СВИНЦА НА БЕЛКИ СИСТЕМЫ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ В УСЛОВИЯХ IN VITRO

И.В. Губарь, О.С. Ильчук, С.И. Куповская, К.П. Осипенко

РЕЗЮМЕ

В работе представлены результаты экспериментального исследования в условиях in vitro влияния микро- (3,3-4,5) мкм и наночастиц свинца (6-10, 26-34 и 50-80) нм в концентрациях (10^{-3} - 10^{-7}) М/л на фибриноген, тромбин и тромбопластин. Токсичность частиц свинца определяли по их способности при инкубации с раствором белка вызывать его денатурацию, вследствие чего изменялась оптическая плотность раствора. Установлено: с уменьшением размера исследуемых частиц свинца увеличивалось их токсическое влияние на белки свертывающей системы крови. При снижении концентрации микро- и наночастиц свинца в инкубационной среде их денатурирующее действие тоже уменьшалась. Чувствительность белков к действию частиц свинца разных размеров обнаружена в следующей последовательности: тромбин>фибриноген>тромбопластин. Выявленные конформационные изменения могут быть обусловлены влиянием микро- и наночастиц свинца на структуру и активность белков, участвующих в процессе свертывания крови.

Ключові слова: свинець, мікрочастинки, наночастинки, білки системи згортання крові, денатурація, дослідження in vitro.

Одним з пріоритетів світової науки є подальший розвиток нанотехнологій. Завдяки своїм унікальним властивостям наноматеріали вже знайшли широке застосування в різних галузях господарства [4,5]. Перспективним є подальше впровадження наноматеріалів та нанотехнологій в медицину, біологію [7,10,11,12], зокрема для вирішення складних екологічних проблем [8,9]. Відсутність ґрунтовних знань щодо ступеня токсичності наноматеріалів та їх потенційної небезпеки для організму вимагає проведення широкого спектру медико-біологічних досліджень. Це в першу чергу стосується наночастинок важких металів, серед яких свинець є одним з найбільш небезпечних забруднювачів виробничого і навколишнього середовищ. Багатокомпонентна система регуляції агрегатного стану крові є досить чутливою до дії важких металів. Дані літератури свідчать

про здатність важких металів, зокрема свинцю, викликати зміни в системі регуляції агрегатного стану крові [1,2,3,6], що обумовлює актуальність порівняльних досліджень токсичності частинок свинцю різних розмірів.

Метою роботи було вивчення в умовах in vitro впливу мікро- (3,3-4,5) мкм та наночастинок свинцю (6-10, 26-34 та 50-80) нм на білки системи згортання крові. Токсичність частинок свинцю визначали за їх здатністю при додаванні до розчину білка спричинити його денатурацію, внаслідок чого змінювалась оптична густина розчину.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Для вивчення денатуруючих властивостей частинок свинцю різних розмірів в умовах in vitro були обрані наступні білки системи згортання крові: фібриноген, тромбін та тромбопластин. Розчини білків

готували на 0,9% NaCl з кінцевою концентрацією білка у реакції - 1 мг/мл, обережно змішували з досліджуваним розчином солі свинцю у співвідношенні 1:1 та інкубували протягом 2 годин при 37 °С.

Для кожного білка виконували серію досліджень: 1 пробірка: 1 мл білка + 1 мл 0,9% NaCl (негативний контроль); 2 пробірка: 1 мл білка + 1 мл 0,1 M HCl на 0,9% NaCl (позитивний контроль); 3-7 пробірки: 1 мл білка + 1 мл розчину солі свинцю в концентраціях (10^{-3} - 10^{-7}) M/л. Оптичну густину досліджуваних проб вимірювали по відношенню до негативного контролю на спектрофотометрі при довжині хвилі 405 нм. Відсоток денатурації в дослідній пробі білка обчислювали відносно позитивного контролю.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати експерименту показали, що інкубація розчинів білків системи згортання крові з мікро- і наночастинками свинцю викликала зміни їх оптичної густини, що свідчить про порушення структури досліджуваних білків, їх денатурацію. Найчутливішим з досліджуваних білків до дії частинок свинцю виявився тромбін. Конформаційні зміни на дещо нижчому рівні зафіксовані при вивченні фібриногену, а денатурація тромбопластину була найслабшою. Виявлено, що вираженість конформаційних змін білків системи згортання крові залежала як від розміру частинок свинцю, так і від їх концентрації в інкубаційному середовищі (табл. 1).

Таблиця 1.

Денатурація білків системи згортання крові у відсотках по відношенню до позитивного контролю

Білок/ розмір частинок свинцю	Відсоток денатурації білків при дії різних концентрацій мікро- і наночастинок свинцю				
	10^{-3} M/л	10^{-4} M/л	10^{-5} M/л	10^{-6} M/л	10^{-7} M/л
Тромбін					
Сульфід свинцю (6-10) нм	42,39	16,20	5,22	1,30	0,76
Сульфід свинцю (26-34) нм	32,39	13,04	2,72	0,87	0,43
Сульфід свинцю (50-80) нм	27,93	10,54	2,07	0,65	0,22
Ацетат свинцю (3,3-4,5) мкм	20,11	9,57	1,74	0,43	0,11
Фібриноген					
Сульфід свинцю (6-10) нм	34,24	11,41	2,5	0,98	0,54
Сульфід свинцю (26-34) нм	26,74	8,91	2,07	0,65	0,22
Сульфід свинцю (50-80) нм	18,70	7,28	1,41	0,33	0,10
Ацетат свинцю (3,3-4,5) мкм	15,76	6,09	1,09	0,21	0
Тромбопластин					
Сульфід свинцю (6-10) нм	25,87	9,02	1,85	0,43	0,22
Сульфід свинцю (26-34) нм	17,72	6,96	1,20	0,33	0,11
Сульфід свинцю (50-80) нм	11,41	5,11	0,87	0,11	0
Ацетат свинцю (3,3-4,5) мкм	8,04	4,13	0,65	0	0

Найбільші структурні порушення білків системи згортання крові притаманні свинцю у формі наночастинок (6-10) нм: за дії максимальної концентрації розчину сульфиду свинцю денатурація тромбіну відносно контролю становила 42,39%, конформаційні зміни фібриногену та тромбопластину визначались на рівні відповідно 34,24% і 25,87%. Інкубація зазначених білків з розчином сульфиду свинцю, розміри частинок якого (26-34) нм, також викликала зміни їх оптичної густини відносно контрольних значень, але дещо меншої інтенсивності. При концентрації солі свинцю в інкубаційному середовищі 10^{-3} M/л показники оптичної густини білків становили: тромбіну - 32,39%, фібриногену - 26,74%, конформаційні зміни тромбопластину дорівнювали 17,72%. Серед досліджених частинок нанодіапазону найменш значну денатурацію викликав сульфід свинцю (50-80) нм: максимальні конформаційні зміни розчину тромбіну відносно контрольних значень - 27,93%, фібриноге-

ну та тромбопластину відповідно 18,70% та 11,41%. За виконаними розрахунками найслабшу токсичну дію чинили частинки мікродіапазону у тій же концентрації 10^{-3} моль/л. Зміни оптичної густини розчинів білків внаслідок денатурації під дією ацетату свинцю (3,3-4,5) мкм становили: тромбіну - максимальна 20,11%, фібриногену - 15,76%, тромбопластину - 8,04%. Слід відмітити, що зниження концентрації мікро- і наночастинок свинцю в інкубаційному середовищі призводило до менш виявлених відносно контролю конформаційних змін білків системи згортання крові, а найнижчі концентрації частинок свинцю (10^{-6} - 10^{-7}) M/л на зміну оптичної густини розчинів білків фактично не впливали.

ВИСНОВКИ

1. Із зменшенням розміру досліджуваних частинок свинцю спостерігалось зростання їх токсичного впливу на білки системи згортання крові.

2. При зниженні концентрації мікро- та наночастинок свинцю в інкубаційному середовищі їх денатуруюча дія теж зменшувалась, а найменші концентрації частинок свинцю змін оптичної густини розчинів білків фактично не викликали.

3. Чутливість білків до дії частинок свинцю різних розмірів виявлена в наступній послідовності: тромбін > фібриноген > тромбопластин.

4. Виявлені конформаційні зміни можуть бути обумовлені впливом мікро- і наночастинок свинцю на структуру і активність білків, що беруть участь в процесі згортання крові.

ЛІТЕРАТУРА

1. Волков Г.Л., Платонова Т.Н., Савчук А.Н. и др. Современные представления о системе гемостаза. - Киев: Наукова думка, 2005. - 296 с.

2. Гогица И.Ф. Экспериментальное и клиническое изучение микроциркуляции при свинцовой интоксикации // Проблемы патологии в эксперименте и клинике. - 1985. - № 7. - С. 177-187.

3. Илюхина Л.Е. Влияние малых доз свинца на гемо- и лимфокоагуляцию. Автореф. дисс. ... канд.-мед.наук: 03.00.13 // Институт физиологии АН Каз. ССР.-Алма-Ата, 1987. - 24 с.

4. Картель М.Т., Терещенко В.П. Концепція методології ідентифікації та токсикологічних досліджень наноматеріалів і оцінки ризику для людського організму та довкілля при їх виробництві і застосуванні // Межведомственный сборник научн. трудов «Химия,

физика и технология поверхности», Киев: Наукова думка. - 2008. - Выпуск 14. - С. 565-583.

5. Кундієв Ю.І., Демецька О.В., Кучерук Т.К. та ін. Біотехнологічна активність частинок нанодіапазону в залежності від їх розміру // Онкологія - 2008. - Т. 10, № 2. - С. 217-220.

6. Подолян С.К. Вплив хлористих сполук важких металів (талію, свинцю, кадмію, ртуті) на систему регуляції агрегатного стану крові і тканинний фібриноліз. Автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.03.04/ Буковинська державна медична академія. - Чернівці, 1998.- 128 с.

7. Розенфельд Л.Г. Нанотехнології, наномедицина: перспективи наукових досліджень та впровадження їх результатів у медичну практику // Український медичний часопис. - 2008. - №5 (67), Т ІХ/Х. - С. 63-68.

8. Чекман І.С., Сердюк А.М., Кундієв Ю.І., Трахтенберг І.М. Нанотоксикологія: напрямки досліджень // Довкілля та здоров'я. - 2009. - № 1. - С. 3-7.

9. Hardman R. A toxicologic review of quantum dots: toxicity depends on physicochemical and environmental factors // Environ. Health Perspect. - 2006. - Vol. 114(2). - P. 165-172.

10. Lanone S., Boczkowski J. Biomedical applications and potential health risks of nanomaterials: molecular mechanisms // Curr. Mol. Med. - 2006. - Vol. 6(6). - P. 651-663.

11. Lewinski N., Colvin V., Drezek R. Cytotoxicity of nanoparticles // Small. - 2008. - Vol. 4 (1). - P. 26-49.

12. Marquis B.J., Love S.A., Braun K.L., Haynes C.L. Analytical methods to assess nanoparticle toxicity // Analyst. - 2009. - Vol. 134 (3). - P. 425-439.