

УДК 57.043, 615.916

ВЛИЯНИЕ НАНО- И МИКРОЧАСТИЦ ПРИРОДНЫХ МИНЕРАЛОВ НА АГРЕГАЦИЮ ТРОМБОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

© 2010 И.Э. Памирский¹, К.С. Голохваст², А.М. Паничев³, М.А. Штарберг¹,
А.Н. Гульков², П.А. Никифоров², С.Ю. Братская⁵, Е.А. Бородин¹

¹ Амурская государственная медицинская академия, Благовещенск

² Дальневосточный государственный технический университет, Владивосток

³ Тихоокеанский институт географии ДВО РАН, Владивосток

⁴ Институт химии ДВО РАН, Владивосток

Поступила в редакцию 16.11.2010

Приводятся результаты исследования влияния суспензий природных минералов (полевой шпат, α -кварц, вулканическое стекло, апатит), включающих фракции нано- и микроразмерных частиц, на агрегацию тромбоцитов человека *in vitro*.

Ключевые слова: *агрегация, тромбоциты, полевой шпат, кварц, вулканическое стекло*

Кристаллы минералов в природе содержатся во всех оболочках Земли и вступают во взаимодействие со всеми формами жизни, в том числе и человеком [1-5, 7-9]. Очевидно, что одной из важных характеристик при взаимодействии твердых минеральных частиц с живой материей, являются их размеры этих частиц.

Цель данного исследования: оценить влияния суспензий природных минералов (полевой шпат, α -кварц, вулканическое стекло, апатит), включающих фракции нано- и микроразмерных частиц, на агрегацию тромбоцитов человека *in vitro*.

Памирский Игорь Эдуардович, кандидат биологических наук, ассистент кафедры биологической химии
Голохваст Кирилл Сергеевич, кандидат биологических наук, заместитель директора Института нефти и газа. E-mail: drooru@mail.ru

Паничев Александр Михайлович, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории экологии и охраны животных

Штарберг Михаил Анатольевич, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник центральной научно-исследовательской лаборатории

Гульков Александр Нефедович, доктор технических наук, профессор, директор Института нефти и газа
Никифоров Павел Александрович, кандидат технических наук, старший преподаватель кафедры технологии металлов и металловедения

Братская Светлана Юрьевна, доктор химических наук, старший научный сотрудник лаборатории сорбционных процессов

Бородин Евгений Александрович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой биологической химии

Материалы и методы. В эксперименте исследовались следующие минералы: полевой шпат (Пш) (Приморский край), вулканическое стекло (Вс) (Богатырское месторождение, Приморский край), α -кварц (Ак) (район реки Большая Уссурка, Приморский край) и апатит (Ап) (Кольский полуостров). Минералы измельчались в планетарной мельнице Fritsch Pulverisette 4 во втором предустановленном режиме в течении 10 минут. Размерность частиц порошков определяли при помощи Fritsch Particle Sizer Analysette 22 (гранулометрический анализ кварца, полевого шпата, вулканического стекла и апатита приведены на рис. 1). Размеры подавляющего числа частиц лежали в диапазоне от 100 нм до 20 мкм (в случае полевого шпата – до 25 мкм). Два пика на всех графиках появляется из-за метода обработки: планетарная мельница сначала измельчает образец до некоторого среднего размера, а потом начинает молоть до наноразмеров. В нашем случае, 10 минут недостаточно для помола всех минералов, отличающихся по шкале твердости Мооса, до одной фракции. Стоит отметить, что измельчение минералов более 10 минут может привести к сдвигу кристаллической решетки.

Определение электрокинетического потенциала (ζ -потенциал) минеральных частиц в электролите (0,9% раствор NaCl) проводили с использованием прибора Zeta Sizer Nano ZS (Malvern, Великобритания) при температуре 25°C, фиксированном угле рассеяния 173° и длине волны лазера 633 нм. Анализ частиц проводился после 30-минутного отстаивания раствора.

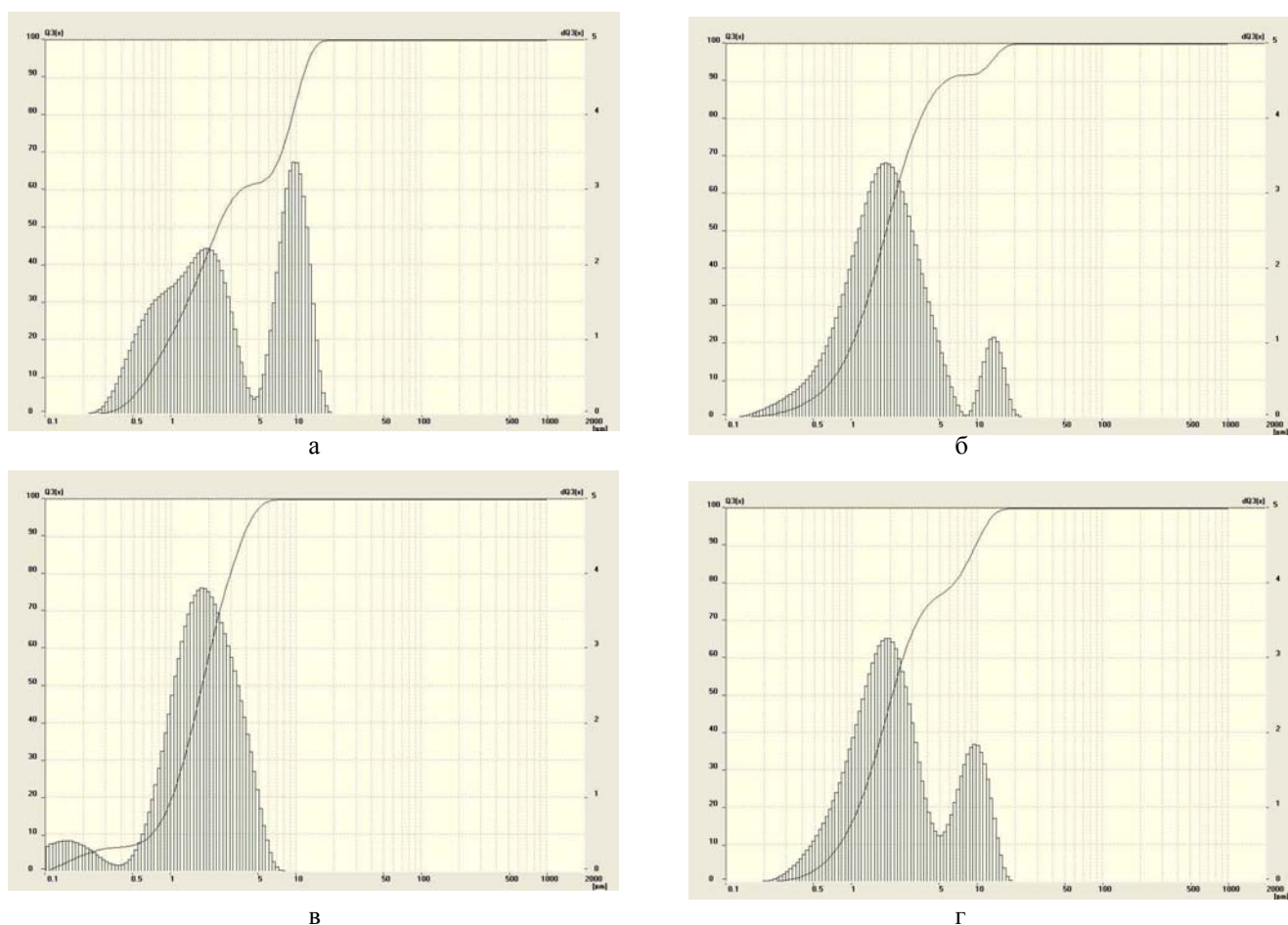


Рис. 1. Гранулометрические диаграммы: а) кварца, б) полевого шпата, в) вулканического стекла, г) апатита. (по оси абсцисс – размер в мкм, по оси ординат – доля частиц определенного размера)

Непосредственно перед исследованием из порошков готовили растворы минералов (0,1 г порошка на 10 мл физиологического раствора), в которых после энергичного непродолжительного встряхивания во взвешенное состояние переходило около $\frac{3}{4}$ части от общего объема порошка. Растворы отстаивали 10 минут, после чего верхнюю часть (не более 3 мл суспензии) аккуратно забирали для исследований. Полученные таким образом суспензии содержали наиболее тонкую фракцию частиц. При стоянии суспензии минералы продолжают медленно выпадать в осадок, поэтому перед внесением в плазму суспензии встряхивали.

Влияние суспензий минералов на агрегацию тромбоцитов исследовали на анализаторе агрегации тромбоцитов AP 2110 («Солар», Беларусь), совмещенного с ПЭВМ. В основе принципа работы агрегометра лежит метод светорассеяния (турбидиметрический метод), предложенный Борном [6]. Нами был использован блок светофильтров с маркировкой «А» (спектральный диапазон от 500 до 700 нм). Измерения проводили согласно инструкции к агрегометру, но с некоторыми изменениями.

Для получения бестромбоцитной и тромбоцитной плазмы кровь брали утром натощак пункцией иглой локтевой вены, самотеком, в пластиковые центрифужные пробирки. Донорами крови были 4 молодых (в возрасте от 25 до 33 лет) практически здоровых мужчин. Для предупреждения свертывания в пробирки предварительно вносили по 1 мл 3,8%-го раствора цитрата натрия (соотношение: 9 мл крови к 1 мл цитрата натрия). Для отделения тромбоцитной плазмы свежую цитратную кровь центрифугировали при 100g в течение 15 минут. Супернатант (тромбоцитная плазма: 330-360 тысяч тромбоцитов на мкл) перемещали в пластиковые пробирки. Оставшуюся кровь повторно центрифугировали при 2000 g в течение 15 минут. Надосадок (бестромбоцитная плазма) отбирали в пластиковые пробирки. Стандартизацию плазмы проводили разведением тромбоцитной плазмы бестромбоцитной плазмой до содержания клеток от $200 \cdot 10^9/\text{л}$ до $250 \cdot 10^9/\text{л}$. В стандартизированной тромбоцитной плазме (далее СТП) исследовали агрегацию тромбоцитов (контрольные и опытные пробы). Анализ плазмы проводили не позднее 3-х часов после забора крови.

В качестве индуктора агрегации использовали раствор динатриевой соли аденозин-5'-дифосфорной кислоты (НПО «Ренам», Россия; далее АДФ) в концентрации вызывающей необратимую агрегацию. Рабочий раствор АДФ №1 содержал 50 мкг АДФ (100 мкМ на 1 мл физиологического раствора). Рабочий раствор АДФ №2 содержал 100 мкг АДФ (200 мкМ на 1 мл физиологического раствора). СТП прогревали в термостате до 37°C. В контрольные пробы вносили по 0,45 мл СТП и 0,1 мл рабочего раствора АДФ №1. В опытные пробы вносили по 0,45 мл СТП, 0,05 мл суспензии минерала (СТП и суспензии минералов не инкубировали) и 0,05 мл рабочего раствора АДФ №2. Таким образом, конечная концентрация АДФ в контроле и опыте составляла около 10 мкг (20 мкМ). При добавлении суспензий в плазму светопоглощение пробы возрастает пропорционально концентрации частиц, что вносит

погрешность при сравнении показателей агрегации тромбоцитов в опытной и контрольной плазме. С целью устранения погрешности для контроля и суспензии конкретного минерала уровень 100%-го светопропускания устанавливается отдельно. Для контроля это бестромбоцитная плазма, для опыта – бестромбоцитная плазма с добавлением суспензии минерала, соответствующей концентрации. Статистическая обработка данных проводилась по t-критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Установлено, что внесение в плазму исследуемых минералов в виде суспензий (10 мг/мл) не вызывает агрегацию тромбоцитов. Агрегация не наступала и при инкубировании (до 60 минут) суспензий с плазмой при 37°C. Результаты влияния минералов на АДФ-инициируемую необратимую агрегацию отображены в таблице 1.

Таблица 1. Влияние суспензий минералов (10мг/мл) на агрегацию тромбоцитов человека *in vitro*

Параметр	Максимальная агрегация, %	Время максимальной агрегации, сек	Скорость агрегации, %/30 сек
Контроль (1)	54,25±0,77	193±7,69	41,2±0,65
Пш (2)	44,4±0,61 P ₁₋₂ ≤0,001	207,5±8,81 P ₁₋₂ ≤0,01	41,9±0,77 P ₁₋₂ >0,5
Контроль (3)	75,75±1,33	217,2±5,74	67,1±0,58
Ак (4)	57,9±0,93 P ₃₋₄ ≤0,001	216,3±4,13 P ₃₋₄ >0,5	52,5±1,2 P ₃₋₄ ≤0,001
Контроль (5)	49,6±0,89	288±7,3	38,6±1,2
Вс (6)	36,9±0,42 P ₅₋₆ ≤0,001	343,5±7 P ₅₋₆ ≤0,001	31,4±0,85 P ₅₋₆ ≤0,001
Контроль (7)	46,43±0,91	265,6±5,61	44,7±0,52
Ап (8)	36,5±0,65 P ₇₋₈ ≤0,001	265,8±6,43 P ₇₋₈ >0,5	36,5±0,77 P ₇₋₈ ≤0,001

В ходе эксперимента было показано, что минеральные суспензии препятствуют агрегации тромбоцитов. Максимальный уровень агрегации по сравнению с контрольными значениями выражен снизился (приблизительно на 10-17% от контроля) в присутствии всех исследуемых минералов. При пересчете значений исследуемых показателей агрегации на абсолютные проценты видно, что суспензии минералов практически не уступают друг другу в снижении уровня агрегации тромбоцитов (рис. 1). Время достижения максимальной агрегации практически не изменялось при добавлении Пш, Ак и Ап, а при добавлении Вс увеличивалось. Третий показатель агрегабельности тромбоцитов, скорость агрегации, снижалась при внесении в плазму Ак, Вс, Ап и Пш не изменил данный показатель. Формы

контрольных и опытных агрегатограмм практически не отличаются.

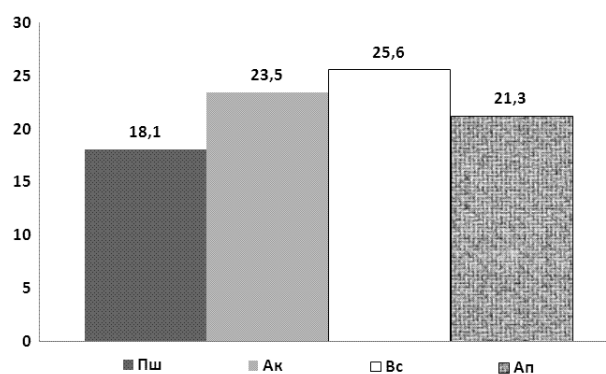


Рис. 2. Влияние суспензий минералов на уровень максимальной агрегации в %.

Можно предположить, что антиагрегационные свойства измельченных минералов могут быть связаны с их сорбционной способностью за счет пористости, а также электростатическими взаимодействиями с мембраной тромбоцитов. Результат определения электрокинетического потенциала исследуемых минералов приводятся в табл. 2.

Таблица 2. Электрокинетический потенциал (ζ -потенциал) минеральных частиц

Образец	ζ -потенциал, мВ
полевой шпат	-28±5
α -кварц	-27±2
вулканическое стекло	-36±1
апатит	-7.1±0.6

Вывод: ζ -потенциал минеральных частиц на агрегацию практически не влияет. Наиболее вероятными причинами подавления агрегации могут быть сорбция белков, АДФ, тромбоцитов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Гагаро, М.А. Коррекция природными цеолитами геостатических сдвигов при активации свертывания

2. Голухваст, К.С. Взаимодействие организмов с минералами. – Владивосток: Изд-во ДВГТУ, 2010. 115 с.
3. Заварзин, Г.А. Планета бактерий // Вестник РАН, 2008. Т. 78, № 4. С. 328-336.
4. Наймарк, Е.Б. Взаимодействие глинистых минералов с микроорганизмами: обзор экспериментальных данных / Е.Б. Наймарк, В.А. Ерошнев-Шак, Н.П. Чижикова, Е.И. Компанцева // Журнал общей биологии. 2009. Т. 70, № 2. С. 155-167.
5. Паничев, А.М. Литофагия в мире животных и человека. – М.; Наука, 1990. 220 с.
6. Born, C.V.R. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and it's reversal // Nature. 1962. V. 194. P. 927-929.
7. Dominy, N.J. Adaptive function of soil consumption: an in vitro study modeling the human stomach and small intestine / N.J. Dominy, E. Davoust, M. Minekus // J. Exp. Biol.. 2004. №207, (Pt 2). P. 319-324.
8. Ketch, L.A. Comparative microbial analysis and clay mineralogy of soils eaten by chimpanzees (*Pan troglodytes schweinfurthii*) in Tanzania / L.A. Ketch, D. Malloch, W.C. Mahaney, M.A. Huffman // Soil. Biol. Biochem. 2001. №33. P. 199-203.
9. Luoba, A.I. Earth-eating and reinfection with intestinal helminths among pregnant and lactating women in Western Kenya // Trop. Med. Int. Health. 2005. №10. P. 220-227.

INFLUENCE OF NANO- AND MICROPARTICLES OF NATURAL MINERALS ON HUMAN THROMBOCYTES AGGREGATION

© 2010 I.E. Pamirskiy¹, K.S. Golokhvast², A.M. Panichev³, M.A. Shtarberg¹, A.N. Gulkov², P.A. Nikiforov², S.Yu. Bratskaya⁴, E.A. Borodin¹

¹ Amur State Medical Academy, Blagoveshchensk

² Far East State Technical University, Vladivostok

³ Pacific Institute of Geography FEB RAS, Vladivostok

⁴ Institute of Chemistry FEB RAS, Vladivostok

Results of research the influence of natural minerals suspensions (feldspar, α -quartz, volcanic glass, apatite), including fractions of nano- and microdimensional particles, on human thrombocytes aggregation in vitro are brought.

Key words: aggregation, thrombocytes, feldspar, quartz, volcanic glass

Igor Pamirskiy, Candidate of Biology, Assistant at the Department of Biochemistry
Kirill Golokhvast, Candidate of Biology, Deputy Director of Oil and Gas Institute.
E-mail: droopy@mail.ru

Alexander Panichev, Doctor of Biology, Leading Research Fellow at the Laboratory of Ecology and Animal Protection

Mikhail Shtarberg, Candidate of Medicine, Senior Research Fellow of the Central Scientific-Research Laboratory

Alexander Gulkov, Doctor of Technical Sciences, Professor, Director of the Oil and Gas Institute

Pavel Nikiforov, Candidate of Technical Sciences, Senior Lecturer at the Department of Metal Technology and Metallurgical Science

Svetlana Bratskaya, Doctor of Chemistry, Senior Research Fellow at the Laboratory of Sorption Processes

Evgeniy Borodin, Doctor of Medicine, Professor, Head of the Biochemistry Department