

УДК 612.8 + 577.1:546

**ВЛИЯНИЕ МИКРОЧАСТИЦ МИНЕРАЛОВ НА РАБОТУ  
ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ И БИОХИМИЧЕСКИХ СИСТЕМ**

<sup>1,2</sup>Голохваст К.С., <sup>3</sup>Памирский И.Э., <sup>4</sup>Бородин Е.А., <sup>5</sup>Сергиевич А.А.,  
<sup>1</sup>Рева Г.В., <sup>1</sup>Ломакин А.В., <sup>1</sup>Красников Ю.А., <sup>1</sup>Чайка В.В., <sup>1</sup>Усов В.В.,  
<sup>1,6</sup>Паничев А.М., <sup>1</sup>Гульков А.Н.

<sup>1</sup>ФГАОУ ВПО «Дальневосточный федеральный университет», Владивосток;

<sup>2</sup>Владивостокский филиал «ДНЦФиПД», Владивосток;

<sup>3</sup>ФГБУН «Институт геологии и природопользования ДВО РАН», Благовещенск;

<sup>4</sup>ГБОУ ВПО «Амурская государственная медицинская академия»

Минздрава России, Благовещенск;

<sup>5</sup>ГОАУ ДПО «Амурский областной институт развития образования», Благовещенск;

<sup>6</sup>ФГБУН «Тихоокеанский институт географии ДВО РАН», Владивосток; e-mail: altexes@mail.ru

Все организмы находятся под непрерывным влиянием окружающей среды, в том числе минеральных частиц различного размера и формы, присутствующих в атмо-, гидро- и литосфере. Для человека контакт с нано- и микрочастицами минералов заметно возрастает в последнее время. Поэтому изучение биологических эффектов минеральных частиц является актуальной междисциплинарной проблемой, стоящей на границе биологии, геологии, химии и физики. В настоящей работе представлены результаты по исследованию агрегации тромбоцитов и ферментативного окисления глюкозы из серии работ *in vitro*, посвященных изучению влияния нано- и микрочастиц α-кварца, полевого шпата, вулканического стекла и апатита на биологические системы. Выявлено, что внесение в плазму исследуемых минералов в виде суспензий *in vitro* препятствует агрегации тромбоцитов человека, а также препятствует окислению глюкозы сыворотки крови под действием глюкозооксидаз. Антиагрегантный эффект минералов возможен за счет сорбции некоторых белков на поверхности частиц и сорбции самих частиц на поверхности тромбоцитов. В совокупности это может приводить к необратимой адгезии клеток к минералам, и одновременно нарушению работы интегрин-нового комплекса, что в итоге препятствует адгезии и агрегации тромбоцитов между собой.

**Ключевые слова:** минеральные частицы, агрегация тромбоцитов, окисление глюкозы

**INFLUENCE OF MICRO PARTICLES OF MINERALS ON FUNCTION  
OF PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL SYSTEMS**

<sup>1,2</sup>Golokhvast K.S., <sup>3</sup>Pamirsky I.E., <sup>4</sup>Borodin E.A., <sup>5</sup>Sergievich A.A., <sup>1</sup>Reva G.V.,  
<sup>1</sup>Lomakin A.V., <sup>1</sup>Krasnikov Yu.A., <sup>1</sup>Chayka V.V., <sup>1</sup>Usov V.V.,  
<sup>1,6</sup>Panichev A.M., <sup>1</sup>Gulkov A.N.

<sup>1</sup>Far Eastern Federal University, Vladivostok;

<sup>2</sup>Vladivostok Branch «FESC PPB SB RAMS – SRI medical climatology and rehabilitation», Vladivostok;

<sup>3</sup>Institute geology and natural management FEB RAS, Blagoveshchensk;

<sup>4</sup>Amur State Medical Academy, Blagoveshchensk;

<sup>5</sup>Amur Institute of Education Development, Blagoveshchensk;

<sup>6</sup>Pacific Institute of Geography FEB RAS, Vladivostok; e-mail: altexes@mail.ru

All organisms are under the continuous influence of the environment, including mineral particles of different sizes and shapes which are present in the atmosphere, hydrosphere and lithosphere. For a human being the contact with nano- and micro-particles of minerals is considerably increasing in the recent years. Therefore, the study of the biological effects of mineral particles is the relevant interdisciplinary problem on the boundary of biology, geology, chemistry, and physics. This paper presents the results of the study of platelet aggregation and enzymatic oxidation of glucose from a series of studies *in vitro*, devoted to the study of the influence of nano- and micro particles of α-quartz, feldspar, volcanic glass and apatite on biological systems. It was revealed that the introduction into the plasma of the studied minerals in suspension *in vitro* prevents the aggregation of human platelets and also prevents the oxidation of glucose of blood serum under the action of glucose oxidase. Anti platelet effect of minerals is possible due adsorption of certain proteins on the surface of the particles and adsorption of the particles themselves on the surface of platelets. All this taken together can result to irreversible cell adhesion to minerals, at the same time malfunction of the integrin complex that as a result prevents the adhesion and aggregation of platelets between each other.

**Keywords:** mineral particles, platelet aggregation, oxidation of glucose

Все организмы находятся под непрерывным влиянием окружающей среды, в том числе минеральных частиц различного размера и формы, присутствующих в атмо-, гидро- и литосфере. Атмосфера Земли содержит более 20 млн т, а 1 м<sup>3</sup> само-

го чистого атмосферного воздуха – не менее 1 млн минеральных взвешенных частиц и взвешенных частиц размером от 0,001 до 1000 мкм [4]. Литр морской воды содержит около 5–6 млн таких частиц [2, 3]. Минеральный состав этих взвесей очень раз-

нообразен. Например, океаническая пыль включает преимущественно галит и сульфаты, а континентальная – кварц, частицы углерода, сульфаты, силикаты, алюмосиликаты, самородное железо, вюстит, сульфиды и другие [1, 4, 5].

Для человека контакт с нано- и микро-частицами минералов заметно возрастает в последнее время. Поэтому изучение биологических эффектов минеральных частиц является актуальной междисциплинарной проблемой, стоящей на границе биологии, геологии, химии и физики.

Настоящая работа представляет результаты по исследованию агрегации тромбоцитов и ферментативного окисления глюкозы из серии работ *in vitro*, посвященных изучению влияния нано- и микрочастиц  $\alpha$ -кварца, полевого шпата, вулканического стекла и апатита на биологические системы.

### Материалы и методы исследования

Объекты исследования: полевой шпат (Приморский край), далее Пш, вулканическое стекло (Богатырское месторождение, Приморский край) – Вс, апатит (Кольский полуостров) – Ап,  $\alpha$ -кварц (район реки Большая Уссурка, Приморский край) – Ак.

*Приготовление нано- и микродисперсных минеральных порошков.*

Образцы измельчались в планетарной мельнице Fritsch Pulverisette 4 во втором предустановленном режиме в течение 10 минут (измельчение минералов более 10 минут может приводить к сдвигу кристаллической решетки). Гранулометрический анализ (размерность частиц) полученных порошков определяли при помощи Fritsch Particle Sizer Analysette 22. Для всех образцов размеры подавляющего числа частиц лежали в диапазоне от 100 нм до 20 мкм (полевой шпат – до 25 мкм).

*Исследование агрегации тромбоцитов.*

Непосредственно перед исследованием из порошков готовили минеральные растворы (0,1 г порошка на 10 мл физиологического раствора), в которых после энергичного непродолжительного встряхивания во взвешенное состояние переходило около 3/4 части от общего объема порошка (визуально), остальная часть сразу оседала. Затем растворы отстаивали 10 минут, после чего верхнюю часть (не более 3 мл суспензии) аккуратно забирали для исследований. Полученные таким образом минеральные суспензии содержали наиболее тонкую фракцию частиц (*ex tempore*). При отстаивании минеральные частицы суспензий продолжали 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), совместного с ПЭВМ. В основе принципа работы агрегометра лежит метод светорассеяния (турбидиметрический метод), предложенный Борном. Нами был использован блок светофильтров с маркировкой «А» (спектральный диапазон от 500 до 700 нм). Измерения проводили согласно инструкции к агрегометру 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 четверо молодых (в возрасте от 25 до 33 лет) практически здоровых мужчин. Для предупреждения свертывания крови 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 минеральных суспензий в плазму светопоглощение раствора возрастает пропорционально концентрации частиц, что вносит погрешность при сравнении показателей агрегации тромбоцитов в опытной и контрольной плазме. С целью устранения погрешности для контроля и конкретной минеральной суспензии уровень 100%-го светопропускания устанавливался отдельно. Для контроля это бестромбоцитная плазма, для опыта – бестромбоцитная плазма с добавлением суспензии минерала, соответствующей концентрации.

*Исследование сорбции АДФ минеральными порошками.*

Способность мелкодисперсных минеральных порошков сорбировать АДФ исследовали на спектрофотометре Unicо 2000 (США) при длине волны 259 нм. Для этого в кварцевые кюветы вносили по 3 мл раствора АДФ (около 12,5 мкМ АДФ на 1 мл физиологического раствора) и измеряли оптическую плотность растворов. Затем в опытные кюветы добавляли по 0,1 мл готовых минеральных суспензий (см. выше) и выдерживали при комнатной температуре 5 минут. Затем контрольные и опытные растворы перемещали в центрифужные пластиковые пробирки и центрифугировали в течение 10 минут при 800 g. После центрифугирования аккуратно переносили растворы в кюветы и повторно измеряли оптическую плотность растворов.

*Определение электрокинетического потенциала минеральных частиц.*

Определение электрокинетического потенциала ( $\zeta$ -потенциал) минеральных частиц порошков проводили в электролите (0,9% раствор NaCl) с использо-

ванием прибора Zeta Sizer Nano ZS (Malvern, Великобритания) при температуре 25°C, фиксированном угле рассеяния 173° и длине волны лазера 633 нм. Анализ частиц проводили после 30-минутного отстаивания раствора.

*Исследование ферментативного окисления глюкозы*

Использовали набор реагентов Новоглюк-КМ («Вектор-Бест», Россия) и спектрофотометр PV1251C («Солар», Беларусь). Готовые минеральные суспензии по 0,1 мл предварительно вносили в опытные пробирки. Далее по 2 мл рабочего реагента (готовился растворением смеси лиофильно высушенных ферментов в фосфатном буфере) вносили в контрольные и опытные пробирки и измеряли оптическую плотность растворов (длина волны 510 нм). Затем в контрольные и опытные пробирки вносили по 0,02 мл сыворотки (пул сыворотки) и помещали на инкубацию в водяную баню на 25 минут при 37°C. После инкубации измерение оптической плотности проводили повторно. Для опытных пробирок была также прединкубация 10 и 20 минут с реагентом (до внесения сыворотки) при комнатной температуре.

Статистическая обработка данных проводилась по t-критерию Стьюдента.

### Результаты исследования и их обсуждение

*Агрегация тромбоцитов человека in vitro.*

Минеральные суспензии не проявили свойства индукторов агрегации как при внесении, так и при инкубации с тромбоцитами (максимальная инкубация длилась 1 час при 37°C). В то же время все суспензии проявили практически одинаковые по силе антиагрегационные свойства (таблица). Так, Пш, Вс, Ак и Ап достоверно снижают уровень максимальной агрегации на 18,1, 25,6, 23,5 и 21,3% соответственно. Вероятно, данный разброс можно объяснить неоднородностью фракций частиц в помоллах.

Влияние суспензий минералов на агрегацию тромбоцитов человека *in vitro*

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

Время достижения максимальной агрегации практически не изменялось при добавлении Пш, Ак и Ап, а при добавлении Вс увеличивалось.

Все суспензии, кроме Вс, практически не изменили время достижения максимума агрегации. Скорость агрегации (уровень агрегации за 30 секунд на наиболее линейном участке) была понижена в пробах с Ак, Вс, Ап, а Пш не изменил данный показатель. Визуально агрегаты в контроле были несколько крупнее. Формы контрольных и опытных агрегатограмм практически не отличаются.

Снижение агрегабельности тромбоцитов под действием суспензий на основе измельченных минералов можно связать с наиболее вероятной причиной – сорбцией. Сорбция минералами тромбоцитов, белков адгезии и агрегации (фибронектин,

витронектин, ламинин, фактора фон Виллебранда и др.), АДФ, ионов Ca<sup>++</sup> и других тромбоцитарных факторов, присутствующих в реакционной смеси, возможна за счет пористости более крупных минеральных частиц, а также электростатических взаимодействий. Причем по отношению к тромбоцитам крупная фракция минералов, видимо, может выступать в роли сорбента, а мелкая – сорбата.

Нами были определены следующие значения электрокинетического потенциала исследуемых минералов: Пш – 28 ± 5 (мВ), Ак – 27 ± 2, Вс – 36 ± 1 и Ап – 7,1 ± 0,6. Таким образом, ζ-потенциал минеральных частиц на агрегацию практически не влияют, а наиболее вероятной причиной подавления агрегации может быть сорбция, связанная со структурными особенностями минеральных частиц и их размерами.

С целью проверки возможности сорбции индуктора агрегации (АДФ) минеральными частицами был проведен дополнительный эксперимент, в результате которого установлено, что после инкубации с минеральными частицами и последующего центрифугирования концентрация АДФ снижалась в пробах с Ак в среднем на 7,2%, Пш – 4,8%, Вс – 6,4%, Ап – 5,6%. Следовательно, приблизительная сорбционная активность минеральных частиц составила около 2,5–3,5 мкМ АДФ на 1 мг порошка. Таким образом, сорбция АДФ частицами имеет место, однако не является единственным объяснением антиагрегационных свойств суспензий. Антиагрегантный эффект минералов также возможен за счет сорбции некоторых белков на поверхности частиц и сорбции самих частиц на поверхности тромбоцитов. В совокупности это может приводить к необратимой адгезии клеток к минералам и одновременно нарушению работы интегринавого комплекса, что в итоге препятствует адгезии и агрегации тромбоцитов между собой.

#### **Влияние минеральных суспензий на активность глюкозооксидазы *in vitro*.**

В образцах без прединкубации в сравнении с контролем Ап снизил показатели оптической плотности на 21%, Вс – 9,8%, Ак и Пш – 7,5%. Прединкубация в течение 10 и 20 минут практически не повлияла на данные показатели процесса окисления глюкозы в сыворотке. Поскольку прединкубация минералов проводилась с реагентом, представляющим собой многокомпонентную смесь (ферменты глюкозооксидаза и пероксидаза, альбумин), нельзя однозначно сказать, на какой этап (фермент) реакции и в какой степени был оказан эффект минеральных частиц. Также нельзя исключить взаимодействие минеральных частиц с другими компонентами реакционной смеси (глюкоза, фенол, 4-аминоантипирин и др.). Таким образом, говорить о вероятном механизме антиокислительного эффекта минеральных суспензий преждевременно.

#### **Выводы**

1. Внесение в плазму исследуемых минералов в виде суспензий выражено пре-

пятствует агрегации тромбоцитов человека *in vitro*.

2. Внесение минеральных суспензий препятствует окислению глюкозы сыворотки крови под действием глюкозооксидазы *in vitro*.

#### **Список литературы**

1. Богатиков О.А. Неорганические наночастицы в природе // Вестник РАН. – 2003. – Т. 73. – № 5. – С. 426–428.
2. Кравчишина М.Д. Вещественный состав водной взвеси устья реки Северной Двины (Белое море) в период весеннего половодья // Океанология. – 2010. – Т. 50. – № 3. – С. 396–416.
3. Лисицын А.П. Процессы океанической седиментации. Литология и геохимия. М.: Наука, 1978. – С. 392.
4. Юшкин Н.П. Минеральный мир и биосфера: минеральный организобиоз, биоминеральные взаимодействия, коэволюция / Минералогия и жизнь: Происхождение биосферы и коэволюция минерального и биологического миров, биоминералогия: материалы IV международного семинара (Сыктывкар, Республика Коми, 22–25 мая 2007 г.). – Сыктывкар. 2007. – С. 5–7.
5. Amorim R. Zeolite structures loading with an anticancer compound as drug delivery systems // Journal of Physical Chemistry. – 2012. – Vol. 116. – P. 25642–25650.

#### **References**

1. Bogatkov O.A. Anorganicis nanoparticles in natura // Bulletin de RAS. 2003. T. 73. no. 5. pp. 426-428.
2. Kravchishyn M.D. Materialis compositio aqueum suspensio Northern Dvina aestuario (Albus Mare) dum vernum aestus // Oceanology. 2010. T. 50. no. 3. pp. 396-416.
3. Lisitsyn A.P. Oceanic processibus sedimentation. Lithology et geochemistry. M.: Nauka, 1978. pp. 392.
4. Yushkin N.P. Mineralis mundi et biosphere: mineralis organizmobioz, biomineral interaction coevolution / Acta IV International Seminar «Mineralogy et vitam: Origine de biosphere et co-evolution of mineralis et biologicum mundos biomineralogiya» (Syktyvkar, Komi Republic, May 22-25, 2007). Syktyvkar. 2007. pp. 5-7.
5. Amorim r. Zeolite structures loading with an anticancer compound as drug delivery systems // Journal of physical chemistry. 2012. Vol. 116. pp. 25642-25650.

#### **Рецензенты:**

Бердников П.П., д.б.н., профессор кафедры патологии, морфологии и физиологии, ФГБОУ ВПО «Дальневосточный государственный аграрный университет» Министерства сельского хозяйства РФ, г. Благовещенск;  
Баталова Т.А., д.б.н., доцент, заведующая кафедрой общей химии, ГБОУ ВПО «Амурская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ, г. Благовещенск.

Работа поступила в редакцию 17.04.2013.