

УДК 612.115:546.815/819.001.4

ДОСЛІДЖЕННЯ ЗМІН В СИСТЕМІ ЗГОРТАННЯ КРОВІ ЗА ВПЛИВУ ЧАСТИНОК СВИНЦЮ МІКРО- ТА НАНОДІАПАЗОНУ

I. В. Губар
ginna5@ukr.net

Державна установа «Інститут медицини праці Національної академії медичних наук України», Україна, м. Київ–03055, вул. Саксаганського, 75

У роботі наведені результати експериментальних досліджень впливу мікро- і наночастинок свинцю на систему згортання крові: на плазму крові дослідних щурів (за зміною коагулометричних показників в умовах in vivo) та на її компоненти (за конформаційними змінами білків системи згортання крові в умовах in vitro). Вплив сполук свинцю з різними розмірами частинок на коагулометричні характеристики плазми крові дослідних тварин характеризувався як гіпокоагуляційний. Встановлено: із зменшенням розміру досліджуваних частинок свинцю зростає їх токсичний вплив на білки системи згортання крові. Чутливість білків до дії

частинок свинцю різних розмірів виявлена в наступній послідовності: тромбін > фібриноген > тромбопластин. Виявлені зрушення можуть бути обумовлені впливом мікро- і наночастинок свинцю на структуру і активність білків, що беруть участь в процесі згортання крові.

Ключові слова: СВИНЕЦЬ, МІКРОЧАСТИНКИ, НАНОЧАСТИНКИ, КОАГУЛОМЕТРИЧНІ ПОКАЗНИКИ, БІЛКИ СИСТЕМИ ЗГОРТАННЯ КРОВІ, ДЕНАТУРАЦІЯ

RESEARCH OF CHANGES IN THE BLOOD COAGULATION SYSTEM EXPOSURING MICRO- AND NANO RANGE OF LEAD PARTICLES

I. V. Gubar
ginna5@ukr.net

State Institution «Institute for occupational health of the National academy of medical sciences of Ukraine», 75 Saksagansky str., Kyiv–03055, Ukraine

The article presents the results of experimental studies of the influence of micro- and nanoparticles of lead on blood coagulation system: on blood plasma of experimental rats (of changes of the coagulometric characteristics in the in vivo conditions) and on its components (of the conformational changes of proteins in the blood coagulation system in vitro conditions). The influence of the lead particles of all sizes on coagulometric characteristics of blood plasma of experimental animals can be described as hypocoagulating. It was established that the decrease in size of lead particles increased their toxic effects on the coagulation system

proteins. The sensitivity of proteins to the lead particles of all sizes found in the following sequence: thrombin > fibrinogen > thromboplastin. Revealed 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.

Key words: LEAD, MICROPARTICLES, NANOPARTICLES, COAGULOMETRIC CHARACTERISTICS, PROTEINS OF BLOOD COAGULATION SYSTEM, DENATURATION

ИССЛЕДОВАНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ В СИСТЕМЕ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ЧАСТИЦ СВИНЦА МИКРО- И НАНОДИАПАЗОНА

И. В. Губарь
ginna5@ukr.net

Государственное учреждение «Институт медицины труда Национальной академии медицинских наук Украины», Украина, Киев–03055, ул. Саксаганского, 75

В работе представлены результаты экспериментальных исследований влияния микро- и наночастиц свинца на систему свертывания крови: на плазму крови опытных крыс (за изменениями коагулометрических показателей в условиях in vivo) и на ее компоненты (за конформационными изменениями белков системы свертывания крови в условиях in vitro). Установлено, что влияние соединений свинца с разными размерами частиц на коагулометрические характеристики плазмы крови опытных животных характеризовалось как гипокреотическое. С уменьшением размера исследуемых частиц свинца наблюдалось увеличение их токсического влияния на белки свертывающей системы крови. Чувствительность белков к действию частиц свинца разных размеров обнаружена в следующей последовательности: тромбин>фибриноген>тромбопластин. Выявленные изменения могут быть обусловлены влиянием микро- и наночастиц свинца на структуру и активность белков, участвующих в процессе свертывания крови.

Ключевые слова: СВИНЕЦ, МИКРОЧАСТИЦЫ, НАНОЧАСТИЦЫ, КОАГУЛОМЕТРИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ, БЕЛКИ СИСТЕМЫ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ, ДЕНАТУРАЦИЯ

Подальший розвиток нанотехнологій є одним з пріоритетів світової науки. Завдяки своїм унікальним властивостям наноматеріали вже знайшли широке застосування в різних галузях господарства [1, 2]. Перспективним є подальше впровадження наноматеріалів та нанотехнологій в медицину, біологію [3–6], зокрема для вирішення складних екологічних проблем [7, 8]. 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 середовища.

Однією з досить чутливих до дії свинцю є багатоконпонентна система регуляції агрегатного стану крові, що являє собою сукупність функціонально-морфологічних і біохімічних механізмів, які забезпечують гемостаз і підтримують рідкий стан крові у судинах [9–11].

Дані літератури свідчать про прямий вплив свинцю на тромбоцитарно-судинний і коагуляційний гемостаз, антизсідальну і фібринолітичну системи, а також про здатність ксенобіотика викликати ушкодження в системі регуляції агрегатного стану крові [12–15].

Відомо, що однією з моделей встановлення загальної токсичності хімічних сполук є білки. Порушення хімічними речовинами їх конформації і функціональної активності відбувається різними шляхами і залежить як від структури токсиканта, так і від будови та функції самого білка [16, 17].

Метою роботи було проведення порівняльних досліджень впливу частинок свинцю мікро- та нанодіапазону на плазму крові дослідних щурів (за зміною коагулометричних показників) та на її компоненти (за конформаційними змінами білків системи згортання крові в умовах in vitro).

Матеріали і методи

Дослідження проводили на статевозрілих щурах лінії Вістар масою 180–200 г, яких утримували в стандартних умовах віварію з вільним доступом до питної води. Тварини були розподілені на 4 групи (по 6 особин у кожній). Першій групі внутрішньоочеревинно вводили колоїдний розчин сульфиду свинцю (PbS) в поліфосфаті натрію в дозі 1,08 мг/кг маси тварини (середній розмір частинок 26–34 нм), другій групі — колоїдний розчин PbS у поліфосфаті натрію в дозі 1,08 мг/кг (середній розмір частинок 50–85 нм), третій групі тварин — водний розчин нітрату свинцю в дозі 1,5 мг/кг маси тіла (середній розмір частинок більше 400 нм); четвертій — контрольній групі щурів — вводили розчин поліфосфату натрію.

Розчини солей свинцю вводили 5 разів на тиждень впродовж 6 тижнів. Дослідження виконували після 30 введень солей металів та через місяць постекспозиційного періоду. Кров у піддослідних тварин забирали під час декапітації під легким ефірним наркозом, стабілізували цитратом натрію, центрифугували 10 хв при 3000 об/хв і відокремлювали плазму від формених елементів. За допомогою наборів реактивів фірми «CORMAY» на коагулометрі «K-3002 Optic» проводили визначення протромбінового часу, а також вимірювали активований частковий тромбопластиновий час (АЧТЧ) та тромбіновий час.

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, 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 М HCl на 0,9 % NaCl (позитивний контроль); 3–7 пробірки: 1 мл білка + 1 мл розчину солі свинцю в концентраціях (10^{-3} – 10^{-7}) М/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.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили з використанням методів варіаційної статистики за допомогою програм статистичного аналізу [18].

Результати й обговорення

Аналізуючи отримані в ході експерименту дані (табл. 1), можна констатувати, що внутрішньоочеревинне введення щурам розчинів сполук свинцю з різними розмірами частинок впливало на функціональну активність білків системи згортання крові, спричинивши зміни коагулометричних показників.

Таблиця 1

Зміни коагулометричних показників периферичної крові щурів за дії мікро- та наночастинок свинцю ($M \pm m$)

Показники	Дослідні групи тварин			
	Контроль	PbS 26–34 нм	PbS 50–80 нм	Pb(NO ₃)> 400 нм
<i>після 30 введень</i>				
Протромбіновий час, с	13,47±0,09	15,95±0,25*	16,35±0,41*	19,63±0,42*
АЧТЧ, с	26,10±0,16	27,12±0,14*	27,40±0,28*	31,02±0,19*
Тромбіновий час, с	5,07±0,19	7,95±0,16*	7,40±0,21*	13,90±0,34*
<i>після постекспозиційного періоду</i>				
Протромбіновий час, с	13,37±0,14	15,38±0,20*	15,20±0,28*	14,25±0,14*
АЧТЧ, с	25,88±0,19	27,05±0,19*	26,50±0,27	26,33±0,23
Тромбіновий час, с	5,15±0,18	7,08±0,21*	6,93±0,27*	7,31±0,23*

Примітка: * — розходження з контролем статистично значиме ($p \leq 0,05$)

Як видно з даних таблиці 1, у динаміці експерименту було виявлено подовження протромбінового та тромбінового часу порівняно з контрольними значеннями, а також зростання активованого часткового тромбопластинового часу, що свідчило про розвиток гіпокоагуляційних змін.

Більш суттєві відхилення показників коагулометричних тестів від контрольних значень спостерігались при субхронічній інтоксикації щурів нітратом свинцю у формі мікрочастинок розміром > 400 нм. Аналогічні зміни дещо меншої інтенсивності спричинила експозиція сульфідом свинцю у вигляді наночастинок розмірами 26–34 нм та 50–80 нм; представлені в таблиці 1 дані свідчать про відсутність суттєвої різниці у вираженості гіпокоагуляційних зсувів за впливу частинок свинцю зазначених нанорозмірів.

Отримані по закінченні постекспозиційного періоду дані свідчили

про відновлення функціональної активності білків системи згортання крові. Слід зазначити, що більш виражена нормалізація коагулометричних характеристик периферичної крові спостерігалась у щурів, що піддавались впливу частинок мікрOMETрового діапазону. Порівняно меншою мірою вплинув постекспозиційний період на відновлення коагулометричних характеристик крові щурів, яким вводили колоїдні розчини сульфиду свинцю у вигляді наночастинок.

Результати експерименту в умовах *in vitro* показали, що інкубація розчинів білків системи згортання крові з мікро- і наночастинами свинцю викликала зміни їх оптичної густини, що свідчить про порушення структури досліджуваних білків, їх денатурацію. Виявлено, що вираженість конформаційних змін білків системи згортання крові залежала як від розміру частинок свинцю, так і від їх концентрації в інкубаційному середовищі.

Таблиця 2

Денатурація білків системи згортання крові у відсотках стосовно до позитивного контролю

Білок/ розмір частинок свинцю	Відсоток денатурації білків при дії різних концентрацій мікро- і наночастинок свинцю				
	10^{-3} М/л	10^{-4} М/л	10^{-5} М/л	10^{-6} М/л	10^{-7} М/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	10^{-3} М/л	10^{-4} М/л	10^{-5} М/л	10^{-6} М/л	10^{-7} М/л
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	10^{-3} М/л	10^{-4} М/л	10^{-5} М/л	10^{-6} М/л	10^{-7} М/л
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

Як видно з таблиці 2 найбільші структурні порушення білків системи згортання крові притаманні свинцю у формі наночастинок розміром 6–10 нм. Інкубація зазначених білків з розчином

сульфиду свинцю, розміри частинок якого становили 26–34 нм, також викликала зміни їх оптичної густини стосовно контрольних значень, але дещо меншої інтенсивності. Серед досліджених частинок

нанодіапазону найменш значну денатурацію викликав сульфід свинцю (50–80) нм. За виконаними розрахунками найслабшу токсичну дію чинили частинки свинцю мікродіапазону в порівнянні з його наночастинками. Слід відмітити, що зниження концентрації мікро- і наночастинок свинцю в інкубаційному середовищі призводило до менш виражених стосовно контролю конформаційних змін білків системи згортання крові, а найнижчі концентрації частинок свинцю 10^{-6} – 10^{-7} М/л на зміну оптичної густини розчинів білків фактично не впливали.

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.

Висновки

1. Вплив сполук свинцю з різними розмірами частинок на коагулометричні показники плазми крові дослідних тварин визначався як гіпокоагуляційний.

2. Із зменшенням розміру досліджуваних частинок свинцю спостерігалось зростання їх токсичного впливу на білки системи згортання крові в умовах *in vitro*.

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

4. Виявлені зрушення у системі згортання крові можуть бути обумовлені впливом мікро- і наночастинок свинцю на структуру і активність білків, що беруть участь у цьому процесі

Перспективи подальших досліджень. Отримані результати стануть основою для подальшого поглибленого вивчення механізмів дії частинок свинцю різних розмірів на компоненти системи згортання крові в умовах *in vivo* та *in vitro*.

1. Kartel M. T., Tereshchenko V. P. Kontsepsiya metodolohiyi identyfikatsiyi ta

toksikolohichnykh doslidzhen nanomaterialiv i otsinky ryzyku dlya lyuds'koho orhanizmu ta dovkillya pry yikh vyrobnytstvi i zastosuvanni [The concept of the methodology for identification and toxicological studies of nanomaterials and risk assessment for human health and the environment during their manufacture and use]. *Mizhvidomchyy zbirnyk nauk. prats «Khimiya, fizyka ta tekhnolohiya poverkhni»* [Interdepartmental collection of Sciences. works «Chemistry, physics and technology of surface»], 2008, no. 14, pp. 565–583 (in Ukrainian).

2. Kundiyeu Yu. I., Demecz'ka O. V., Kucheruk T. K. Biotekhnologichna aktyvnist chastynok nanodiapazonu v zalezhnosti vid yix rozmiru [Active biotech nanodiapazonu particles depending on their size]. *Onkologiya — Oncology*, 2008, vol. 10, no. 2, pp. 217–220 (in Ukrainian).

3. Rozenfeld L. G. Nanotekhnologiyi, nanomedycyna: perspektyvy naukovykh doslidzhen ta vprovadzhennya yix rezultatuv u medychnu praktyku [Nanotechnology, nanomedicine: perspectives for research and implementation of their results in medical practice]. *Ukrayinskyj medychnyj chasopys — Ukrainian Medical Journal*, 2008, vol. IX/X, no. 5 (67), pp. 63–68 (in Ukrainian).

4. Lanone S., Boczkowski J. Biomedical applications and potential health risks of nanomaterials: molecular mechanisms. *Current Molecular Medicine*, 2006, 6, (6), pp. 651–663.

5. Lewinski N., Colvin V., Drezek R. Cytotoxicity of nanoparticles. *Small*, 2008, 4, (1), pp. 26–49.

6. Marquis B. J., Love S. A., Braun K. L., Haynes C. L. Analytical methods to assess nanoparticle toxicity. *Analyst*, 2009, 134, (3), pp. 425–439.

7. Chekman I. S., Serdyuk A. M., Kundiyeu Yu. I., Traxtenberg I. M. Nanotoksikologiya: napryamky doslidzhen [Nanotoksikologiya: research directions]. *Dovkillya ta zdorovya — Environment and Health*, 2009, no. 1, pp. 3–7 (in Ukrainian).

8. Hardman R. A toxicologic review of quantum dots: toxicity depends on physicochemical and environmental factors. *Environmental Health Perspectives*, 2006, 114, (2), pp. 165–172.

9. Volkov G. L., Platonova T. N., Savchuk A. N. *Sovremennyye predstavleniya o sisteme gemostaza* [Modern views on the hemostatic]. Kiev, Naukova Dumka, 1995. 293 p. (In Russian).

10. Baluda V. P. *Fyzyologyya systemy gemostaza* [Physiology of the hemostatic system]. Moscow, Medicine, 1995. 293 p. (In Russian).
11. Grycyuk O. J., Amosova K. M., Grycyuk I. O. *Praktychna gemostaziologiya* [Practical hemostaziology]. Kiev, Zdorovya, 1994. 256 p. (In Ukrainian).
12. Gogyna Y. F. Экспериментальное и клиническое изучение микроциркуляции при свинцовом отравлении [Experimental and clinical study of microcirculation in lead intoxication]. *Проблемы патологии в эксперименте и клинике* — *Problems of pathology in experimental and clinical*, 1985, no. 7, pp. 177–187 (In Russian).
13. Ylyukhyna L. E. *Vlyyanye mal'kikh doz svyntsa na hemo- y limfokoagulyatsiyu. Dyssertatsiya kandydata medytsynskikh nauk* [Effects of low doses of lead on hemo- and limfocoagulation. Ph.D. medical sci. diss.]. Alma-Ata, 1987. 24 p. (In Russian).
14. Podolyan S. K. *Vplyv khlorystykh spoluk vazhkykh metaliv (taliyu, svyntsyu, kadmiyu, rtuti) na systemu rehulyatsiyi ahrehatnoho stanu krovi i tkannynnyy fibrynoliz. Dyssertatsiya kandydata medychnykh nauk* [Effect of chloride compounds of heavy metals (thallium, lead, cadmium, mercury) on the system of regulation of the physical state of the blood and tissue fibrinolysis. Ph.D. medical sci. diss.]. Chernivtsi, 1998. 128 p. (In Ukrainian).
15. Zerbyno D. D., Lukasevych L. L. *Dessymynirovannoe vnutrysosudystoe svertivaniye krovy. Fakty y koncepcyyu* [Dessiminated intravascular coagulation. Facts and concepts]. Moscow, Medicine, 1989. 335 p. (In Russian).
16. Lujk A. M., Lukyanchuk V. D. *Syvorotochnyy albumyn y byotransport yadov* [Serum albumin and poisons biotransport]. Moscow, Medicine, 1984. 224 p. (In Russian).
17. Shymanovskiy L. N. *Syvorotochnyy al'bumyn — transportnaya receptornaya sistema dl'ya fyzyologicheskyy aktivnykh veshchestv* [Serum albumin — transport receptor system for physiologically active substances]. *Farmakologiya y toksykologiya* — *Pharmacology and Toxicology*, 1984, no. 2, pp. 93–100 (In Russian).
18. Antomonov M. Yu. *Matematicheskaya obrabotka y analiz mediko-biologicheskyykh dannyyh* [Mathematical processing and analysis of biomedical data]. Kiev, FMD, 2006. 558 p. (In Russian).