

ИЗУЧАВАНЕ НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕТО МЕЖДУ ЧАСТИЦИТЕ НА ПРАХООБРАЗЕН ПРИРОДЕН КЛИНОПТИЛОЛИТ И КЛЕТКИТЕ НА ЕРИТРОЦИТИ И МАКРОФАГИ ОТ КРЪВТА

Славейко Цветков¹, Калинка Михайлова²

¹Минно-геоложки университет „Св. Иван Рилски“, София, sltzvetkov@mail.bg
²УПБАЛСМ „Н. И. Пирогов“

РЕЗЮМЕ. С помощта на хемилуминисцентни изследвания е изучено действие на прахообразен клиноптилолитов зеолит върху перитониалните макрофаги и хемолизата на еритроцитите от кръвта на плъхове. Показано е, че токсичното действие на зеолита зависи от съдържанието на минерала клиноптилолит (CPT) в него, както и то начина на получаване на прахообразната фракция. Хидрираните H^+ и модифицираните NH_4^+ , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} форми намаляват цитотоксичния ефект на пробите, докато окислителния метаболизъм на тези проби върху клетките нараства. Най-токсично действащите проби намаляват макроенергетичните елементи на макрофагите. Токсичното действие на зеолитите зависи от съдържанието на H_2O_2 . Цитотоксичното действие на зеолита се изразява в енергичното възпрепятстване действието на ферментите, разрушаващи водородния пероксид.

STUDYING THE INTERACTION BETWEEN PARTICLES OF POWDERED NATURAL CLINOPTILOLITE AND CELLS OF ERITROCYTES AND MACROPHAAGS IN THE BLOOD

S. Tzvetkov¹, K. Mihaylova²

¹University of Mining and Geology "St. Ivan Rilski", 1700 Sofia, sltzvetkov@mail.bg
²UMBALSM "N.I. Pirogov"

ABSTRACT. The hemiluminescence response of peritoneal macrophages and the erythrocytes of rat, caused by clinoptilolite (CPT) particles were studied. It was shown, that the toxic action of CPT depends on the mineral content and the way of preparation of the dust particles. Hydration of the dust, as well as its modification with NH_4^+ , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} lower the cytotoxic effect of samples, while their ability for activation of the oxidizing metabolism of the cells (hemiluminescence) increases. The most toxic samples lower the stock of macroenergetic compounds in macrophages. To the opposite, the quantity of ATR is increased during the incubation of the cells with modified samples of CPT. The conclusion is that the toxic properties of zeolites are caused by H_2O_2 , which forms when dust particles and cell membranes interact. The cytotoxic properties of CPT are strongly inhibited by ferments, which destroy the hydrogen.

Въведение

Известно е, че зеолитите, притежават уникални сорбционни и каталитични свойства, благодарение на които намират широко и разнообразно приложение в промишлеността и селското стопанство. От голямото разнообразие на зеолитовите минерали с най-голяма популярност се ползват природните клиноптилолити, поради по-широкото им разпространение в световен мащаб, включително и нас. Ограничени са, обаче, изследванията относно влиянието на този природен минерал и по-специално на частиците на вдишваните прахообразни частици върху живите организми и резултатите за биологичното въздействие на този минерал са крайно недостатъчни. В някои работи се публикуват данни за възпалителни и алергични реакции на човека [1], а в други се посочва, че подобни процеси, които протичат под действието на водороден пероксид, се катализират на повърхността на частица от клиноптилолит. През последните години се появиха и статии в специализираната научната литература за участие на H_2O_2 във възпалителни [2] и алергични [3] реакции на организма. Потвърдена е известната цитотоксичност на водородния

пероксид в различни клетки - бактериални, възпалителни (туморни), ендотелиални, фагоцити и еритроцити [4,5].

Нашите изследвания в показаната статия отразяват резултатите за особеното биологично въздействие на природен клиноптилолитов зеолит, в зависимост от неговото месторождение, начин на получаване на прахообразните образци, различни модифицирани форми.

Надявахме се да получим нови осветляващи факти, отразяващи участието на H_2O_2 в реакциите при повреждане на клетъчната мембрана от клиноптилолита.

Експериментална част

Изследвани са клиноптилолитови проби от 4 различни световно известни природни месторождения: „Бели пласт“ - България; „Хекордзула“ - Грузия; „Хектор“ - САЩ; „Итая“ - Япония. Скалният материал е раздробяван отначало в топкови мелници, след което с въздушна или водна сепарация се отделяли респираторната фракция на частиците по известна методика [6]. Модифицирани проби

са правени само с природните зеолити от „Бели пласт“ и „Хектор“ по стандартна методика. Претегленото количество зеолитови частици поставяли в разтвор на натриев хлорид с концентрация $0,11 \text{ mol/dm}^3$ при рН 7-7,4. Еритроцитите от кръвта на плъховете отделяли по известния начин [7]. Хемолитичната активност на праховите частици е определяна по количеството на неразрушените клетки на хемоглобина след инкубацията му с клиноптилолитовия прах при 20°C , които се определяли спектрофотометрично по поглъщането при 540 nm през 60 мин. Макрофагите се отделяли от

периториалните дробове на бели плъхове, а тяхната метаболитна активност под действие на зеолита се регистрирала по изменение на интензитета на хемолуминисценцията в присъствие на луминол.

Опитни резултати и обсъждане

Установено е, че пробите на всички изпитвани зеолити предизвикват хемолитични изменения на еритроцитите т.е повреждат клетките. В таблица 1 са отразени получените резултати:

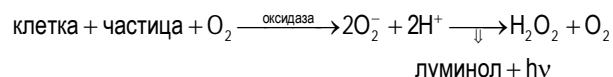
Таблица 1.

Влияние на различни видове клиноптилолит върху еритроцити и макрофаги

Клиноптилолит	Метод на сепарация	Не/модифициран образец	Хемолитична активност, %	Токсичност, Т
„Итая“	въздушна	немодифициран	76,0	190,0
„Хекордзула“	водна	немодифициран	73,0	50,0
„Хектор“	водна	немодифициран	9,6	36,0
„Хектор“	водна	K^+	8,4	16,6
„Хектор“	водна	Ca^{2+}	4,9	18,6
„Бели пласт“	водна	немодифициран	56,0	61,5
„Бели пласт“	водна	Na^+	23,0	41,0
„Бели пласт“	водна	K^+	18,0	43,0
„Бели пласт“	водна	NH_4^+	18,0	33,0
„Бели пласт“	въздушна	немодифициран	93,0	205,0

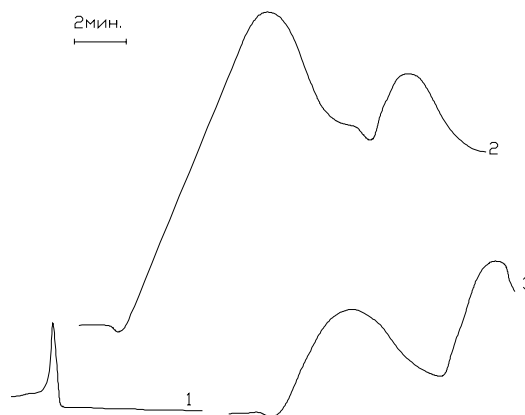
Когато в суспензията на еритроцитите преди поставяне на зеолита се внесат ферменти, които разлагат водородния пероксид (каталаза, пероксидаза), се стига до рязко потискане на хемолитичната активност на твърдите частици. Фермента супероксидисмутаза, който спомага за образуване на H_2O_2 не влияе върху хемолизата, предизвиквана от честиците на зеолита. Това показва, че само ферментативните реакции, в резултат на които се понижава съдържанието на водороден пероксид в средата, притежават защитен ефект от действието на клиноптилолитовия прах.

По всяка вероятност, при контакта на твърдата частица с клетъчната мембрана се катализира образуване на голямо количество водороден пероксид, което показва мощния цитотоксичен ефект на зеолитовия прах. Това предположение беше потвърдено от хемилуминисцентното взаимодействие на макрофагите в присъствие на частици от зеолит. Светенето в клетъчната суспензия обикновено възниква при спонтанна дисмутация на супероксидните анион-радикали и се усилва в присъствие на луминол:



Колкото по-бързо протича горната реакция с образуване на водороден пероксид, толкова по-ярко е светенето в изследваната клетъчна суспензия. На фиг.1 е показано сравнително величината на хемилуминисценцията на макрофагите с добавка от различни проби клиноптилолит. Както се вижда от фигурата, най-токсичния българския зеолит „Бели пласт“ предизвиква моментна светкавица на хемилуминисцентните макрофаги, след което се установява рязко намаление на светлината. Такова явление се наблюдава при гибел на макрофагите.

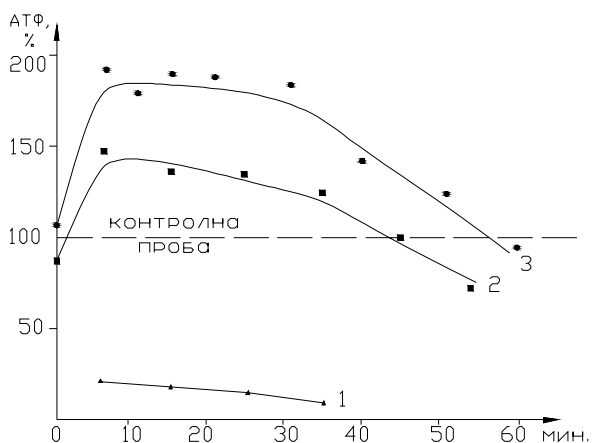
Същият зеолит, но получен при мокра сепарация или добавен след предварително след прибавянето на ензима каталаза, води до по-бавно, но по-интензивно нарастване на светлината от хемилуминисценцията. Получените криви могат да послужат за определяне на величината токсичност [10]. Получените резултати са показани в таблица 1, откъдето се вижда, че те добре корелират с хемолитичната активност на този природен клиноптилолит.



Фиг.1. Луминисценция на макрофаги в присъствие на клиноптилолит: 1 – „Бели пласт“, въздушна сепарация; 2 – „Бели пласт“ без каталаза; 3 – „Бели пласт“, водна сепарация

В серия от експерименти е направен опит да се установи съдържанието на АТФ (макроенергични съединения) в макрофагите, което се явява основен източник на енергия в клетките. На фигура 2 се вижда, че клиноптилолит „Бели пласт“ (въздушна сепарация) само след няколко минути предизвиква практически пълна хидролиза на изходния запас от АТФ, докато пробата от водно сепарирания зеолит съществено повишава неговото

количество в сравнение с контролното му съдържание. Подобно поведение се наблюдава и когато заедно с клиноптилолита в макрофагите е внесен ензима каталаза ($0,25 \text{ mg/dm}^3$). Това води до заключението, че токсичното действие на клиноптилолита по отношение на еритроцитите и макрофагите зависи от състава на минерала и начина на получаване на прахообразните частици. Водносепарираните и модифицирани проби понижават цитотоксичността на зеолита и активират окислителния метаболизъм на клетките. Пробите с най-ясно изразено токсично действие намаляват запасите от макроенергичните съединения в макрофагите, докато модифицираните зеолитови образци, както и в присъствието на каталаза, предизвикват увеличение на АТФ.



Фиг.2. Изменение на АТФ в суспензия на макрофаги, инкубирани с клиноптилолит: 1 – „Бели пласт“, въздушна сепарация; 2 – „Бели пласт“, водна сепарация; 3 – „Бели пласт“ в присъствие на каталаза

Препоръчана за публикуване от катедра „Химия“, МТФ

Изводи

1. Токсичните свойства на природните клиноптилолитови зеолити се дължат на получения при взаимодействие на прахообразните частици с клетъчните мембрани H_2O_2 .

2. Цитотоксичността на зеолита се инхибира с добавка на ферменти, разрушаващи водородния пероксид.

Литература

1. Brown R.C., *Toxicology*, 17, 18, 1990.
2. Weiss S.J., Lobuglio A.F., *Lab. Invest.* 47,5, 1992.
3. Clastier S., Chin D.T.U., Quintanilha D., Libin B., *Blood*, 64, 1079, 1994.
4. Del Maestro R.,F., *Can.J.Physiol.Parmacol.* 60, 1460, 1992.
5. Chezzi P., Bianchi, Mantovani A., *Biophys. Res. Commun.*, 119, 144, 1994.
6. David A., Hurych J., Effenbergerova E., *Environ. Res.* 24, 140, 1991.
7. Gormley I.,F., Wright M.O., Ottery J., *Ann. Occup. Hyg.* 21, 141, 1991.