

ВНУТРЕННИЕ БОЛЕЗНИ

УДК 579.22:681.785.542]:546.824-31

ИЗМЕНЕНИЕ ПАРАМЕТРОВ АУТОФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ЛИЗОЦИМА ПОД ДЕЙСТВИЕМ ДИОКСИДА ТИТАНА

Аляхнович Н.С.¹, Скоробогатова А.С.², Садовничук М.Д.²

¹Витебский государственный медицинский университет,
г. Витебск, Республика Беларусь,

²Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси,
г. Минск, Республика Беларусь

Введение. Изучение люминесценции белков системы иммунитета (по флуоресценции аминокислотных остатков триптофана, тирозина и фенилаланина в их составе) – является одним из направлений биомедицинских исследований. Высокая чувствительность параметров флуоресценции к различным физико-химическим воздействиям широко используется для изучения структурных изменений в белках. Исследования о накоплении титана в организме позволяют предположить, что именно белки биологических жидкостей (плазмы крови, слюны, желудочного и кишечного сока) являются транспортной системой для частиц диоксида титана (TiO₂) – белого пигмента, широко применяющегося в пищевой и фармацевтической промышленности [1]. Показано, что под влиянием TiO₂ происходят физические изменения свойств биологических жидкостей и самого титана [2]. Лизоцим – простая и показательная модель для изучения действия TiO₂, поступающего пероральным путем, на систему врожденного иммунитета [3].

Цель. Установить влияние частиц диоксида титана на параметры аутофлуоресценции рекомбинантного лизоцима.

Материал и методы. Для оценки влияния частиц TiO₂ на параметры флуоресценции лизоцима, нами использовались три вида частиц TiO₂ (наночастицы (НЧ), микрочастицы (МЧ) и частицы, применяющиеся в пищевой промышленности (далее «пищевой TiO₂»)) в концентрациях 0,001 и 0,0001 мг/мл. Концентрации выбраны с учетом литературных данных о средней расчетной суточной дозе потребления и в 10-кратном разведении [1].

Учитывая данные о быстрой осаждаемости частиц TiO₂, суспензию обрабатывали ультразвуком с частотой 40 Гц в течение 15 минут и перемешивали на вортексе перед непосредственным применением. Рекомбинантный лизоцим для эксперимента разводили в фосфатном буфере, рН 7.2 до концентрации 0,05 мг/мл и по 1 мл вносили в кювету (длина оптического пути – 1 см) для изучения спектрально-люминесцентных свойств при длине волны возбуждения $\lambda_{ex}=256$ нм. Спектр аутофлуоресценции оценивали в диапазоне волн испускания 310–450 нм. Эксперимент проводили путем добавления к раствору лизоцима взвеси каждого вида частиц TiO₂ в двух концентрациях и сравнении собственной люминесценции лизоцима исходно и после 30 и 60 минут инкубации в термостате при 37°C. Флуоресценция суспензии частиц TiO₂ определялась при тех же параметрах.

Результаты исследований. Пик аутофлуоресценции лизоцима наблюдался при длине волны 340 нм и достигал 500 относительных единиц (I_{фл} ~ 500 отн. ед.). Частицы TiO₂ трех видов показывали максимальную оптическую плотность до 100 отн. ед. при 400 нм, а при 340 нм – их флуоресценция была близка к нулю.

И время экспозиции, и присутствие частиц TiO₂ оказывали достоверное влияние на показатели аутофлуоресценции лизоцима (Main effects Anova, FTiO₂ = 52,5 p<0,000001; Fвремя = 52,6 p<0,000001). Причем максимум аутофлуоресценции лизоцима снижался через 30 минут инкубации в термостате даже без TiO₂ (с 500 отн.ед. до 350 отн.ед. через 30 минут и до 340-310 через 60 минут), но не настолько значительно, как в присутствии TiO₂ (с 450 отн. ед. в первый момент времени до 330-10 отн. ед. через 30 минут, и до 50-1 отн. ед. через 60 минут) (табл. 1).

Под действием частиц TiO₂ всех исследованных видов и концентраций через 60 минут инкубации происходило полное подавление аутофлуоресценции лизоцима, причем фактор времени играл значительную роль (Main effects Anova Fвремя = 55,9 p=0,000001) (табл. 1).

Обнаружено взаимовлияние времени экспозиции и концентрации частиц TiO_2 (Factorial Anova Fвремя/концентрация = 6,0 $p=0,016$).

Достоверной разницы между действием разных видов частиц и в разных концентрациях не обнаружено, но в случае меньшей концентрации TiO_2 эффективнее ингибировал флуоресценцию лизоцима уже через 30 минут (табл. 1).

Наибольшее влияние на параметры аутофлуоресценции лизоцима оказывали НЧ в концентрации 0,0001 мг/мл, полностью подавляя ее уже через 30 минут ($I_{фл} \sim 10$ отн. ед.), при этом в большей концентрации НЧ оказывали такое же действие только после 60 минут инкубации ($I_{фл} \sim 5$ отн. ед.) (табл. 1).

Таблица 1 – Показатели аутофлуоресценции чистого лизоцима и лизоцима в присутствии частиц TiO_2

Время экспозиции, минуты	Аутофлуоресценция, относительные единицы					
	Лизоцим (Λ) / Λ + НЧ TiO_2		Λ / Λ + МЧ TiO_2		Λ / Λ + Пищевой TiO_2	
	Концентрация частиц TiO_2 , мг/мл					
	0,0001	0,001	0,0001	0,001	0,0001	0,001
0	500/490	500/450	500/450	500/430	500/450	500/410
30	350/10	350/310	350/100	350/140	350/150	350/330
60	340/1	310/5	320/1	330/5	310/20	330/50

Обе концентрации TiO_2 в виде микрочастиц в 4 раза снижали аутофлуоресценцию лизоцима после 30 минут ($I_{фл} \sim 100-140$ отн. ед.), полностью ингибировали – после 60 минут инкубации ($I_{фл} \sim 1-5$ отн. ед.) (табл. 1). Под действием частиц пищевого TiO_2 в меньшей концентрации после 30 минут инкубации аутофлуоресценция лизоцима снижалась в 3 раза ($I_{фл} \sim 150$ отн. ед.), по сравнению с исходными пробами, и в 2 раза, по сравнению с контрольными без TiO_2 ($I_{фл} \sim 350$ отн. ед.), а после 60 минут – TiO_2 в обеих концентрациях снижал аутофлуоресценцию лизоцима до 20-50 отн. ед. (табл. 1).

Большая эффективность подавления аутофлуоресценции лизоцима под действием TiO_2 в концентрации 0,0001 мг/мл, вероятно, связана с меньшей агрегацией его частиц в суспензии при разведении. С помощью программы UniProtKB (<https://www.uniprot.org/uniprotkb/P61626/entry>) показано, что циклические флуоресцирующие аминокислоты (триптофан и тирозин) находятся возле активного центра лизоцима, соответственно, снижение параметров аутофлуоресценции лизоцима может сочетаться с нарушением его функции.

Выводы.

1. Диоксид титана в расчетных среднесуточных концентрациях значительно подавлял параметры аутофлуоресценции лизоцима, вероятно, путем связывания с аминокислотами в районе активного центра.

2. Обнаружена обратная зависимость эффективности подавления флуоресценции лизоцима от концентрации исследованных частиц TiO_2 – меньшая концентрация (0,0001 мг/мл) всех видов частиц сильнее снижала оптическую плотность раствора лизоцима уже через 30 минут.

3. Обе концентрации нано- и микрочастиц TiO_2 полностью, а пищевой диоксид титана – значительно, подавляли флуоресценцию лизоцима через 60 минут.

Литература:

1. Racovita, A.D. Titanium Dioxide: Structure, Impact, and Toxicity / A.D. Racovita // Int J Environ Res Public Health. – 2022. – Vol. 19, N 9. – P. 5681. doi:10.3390/ijerph19095681
2. Аляхнович, Н.С. Взаимодействие диоксида титана с биологическими средами организма / Н.С. Аляхнович, Д.К. Новиков // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2016. – № 1. – С. 37-42. doi: 10.14427/jipai.2016.1.37
3. Лизоцим – грани возможного [Электронный ресурс] / В.Г. Овсянников [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2020. – № 3. – Режим доступа: <https://science-education.ru/article/view?id=29903>. – Дата доступа: 01.11.22.