



УДК 546.284-31:543.42

© 2012

**Н. П. Галаган, В. М. Гунько, Н. Г. Порхун, Е. А. Новикова,
В. В. Туров**

Влияние дисперсности нанокремнеземов на их биоактивность по отношению к гаметам быка

(Представлено членом-корреспондентом НАН Украины Н. Т. Картелем)

Методом лазерно-корреляционной спектроскопии (ЛКС) изучено влияние разных модификаций нанокремнезема на подвижность гамет быка. Результаты исследований методом ЛКС сопоставлены с данными метода низкотемпературной ^1H ЯМР-спектроскопии о строении гидратных оболочек наночастиц кремнеземов. Полученные результаты свидетельствуют об активировании подвижности (максимальной для нанокремнезема ОХ-50) при кратковременном контакте клетка — частица. Ингибирование подвижности происходит при формировании долгоживущих многоцентровых комплексов клетка — наночастица.

Наноразмерные, или наноструктурированные, кремнеземы широко используются в медицинской практике в качестве энтеросорбентов, эффективно связывающих как токсины белкового происхождения, так и сопутствующих компонентов в ряде таблетированных лекарственных форм [1, 2]. В биологических средах наночастицы кремнезема могут связываться с клетками за счет межмолекулярных взаимодействий, конечным результатом которых может быть агглютинация. При этом клетки не погибают, но теряют свою активность и, как следствие, метаболические процессы в них замедляются. В ходе исследований некоторых микроорганизмов установлено [3], что в суспензиях, содержащих 2–6% по массе кремнезема и 10^5 – 10^9 бактерий в миллилитре, происходит связывание более 99% всех микроорганизмов. Однако при малой концентрации кремнезема (<0,1% по массе) отмечается его способность оказывать на клетки стимулирующий эффект, проявляющийся в их интенсивном размножении и ускорении процессов метаболизма [4, 5].

Связывание наночастиц с клетками является сложным, многостадийным процессом. Можно выделить три основные стадии адсорбционных взаимодействий [6]. *Первая* — сближение частицы с клеткой, которая контролируется электростатическими дальнедействующими взаимодействиями, строением ДЭС (двойного электрического слоя) частицы и клетки, подвижностью клеток и диффузией наночастиц. *Вторая* — осуществление “точечного” контакта (одна или несколько межмолекулярных связей), при котором большое зна-

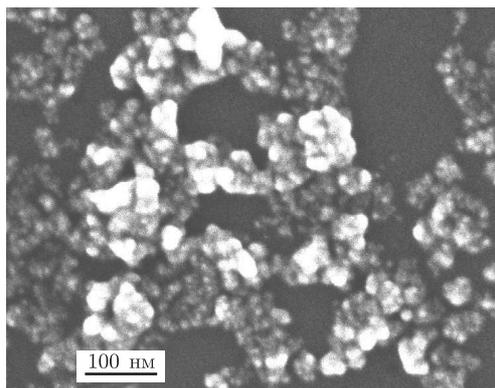


Рис. 1. Электронная микрофотография агломерата аэросила А-300 (45) размером 5 мкм

чение приобретает взаимодействие между разнополярными активными центрами поверхности кремнезема и клеток (например, ОН-группами кремнезема и электронодонорными группами мембран). *Третья* — формирование стабильных комплексов клетка — частица, образующихся в результате многоцентровых межмолекулярных взаимодействий с участием биомолекул, локализованных на поверхности клеток (интегральные белки, олигосахаридные и фосфолипидные структуры и др.)

Наиболее надежным и информативным методом определения структурных и термодинамических характеристик границ раздела в биосистемах является метод низкотемпературной ^1H ЯМР-спектроскопии [7]. Было установлено, что и клетки, и частицы нанокремнезема в водной среде сильно гидратированы, причем толщина слоя связанной воды может достигать десятков молекулярных слоев, т. е. располагаться от поверхности на расстоянии до 10 нм [7]. Как и в объеме воды, молекулы связанной воды формируют сетку водородных связей, но отличающуюся от объемной. Для осуществления точечного или многоцентрового контакта клетка — частица часть межфазной воды должна быть удалена из зоны контакта, что сопровождается значительной перестройкой гидратной оболочки взаимодействующих клеток и наночастиц кремнезема [8, 9]. Следовательно, изменения гидратационных характеристик частиц связаны с изменением характера их взаимодействий.

Целью исследований авторов настоящего сообщения было: 1) определение стадии взаимодействий клетка — частица, являющейся проявлением биоактивности нанокремнезема и ускоряющей клеточный метаболизм; 2) сопоставление размерного фактора — среднего размера наночастиц кремнезема, а также параметров связанной воды с биоактивностью кремнеземов.

Методика исследований. В экспериментах использовали нанокремнезем А-300 производства Калушского опытно-экспериментального завода Института химии поверхности им. А. А. Чуйко НАН Украины с насыпной плотностью (d_n), равной 45 г/л, (А-300 (45)), уплотненную форму нанокремнезема с d_n , равной 394 г/л, (А-300 (394)); водную суспензию ОХ-50 фирмы “Degussa” (Германия). Уплотненный кремнезем получали путем механохимической обработки А-300 в шаровой мельнице в присутствии фиксированных количеств воды [10].

Нанокремнезем А-300 (45) представляет собой агломераты первичных частиц (средний диаметр 9 нм) со структурой, включающей полости (текстурные поры) диаметром до 50 нм (рис. 1). Нанокремнезем ОХ-50 был использован в виде стабильной суспензии, состоящей

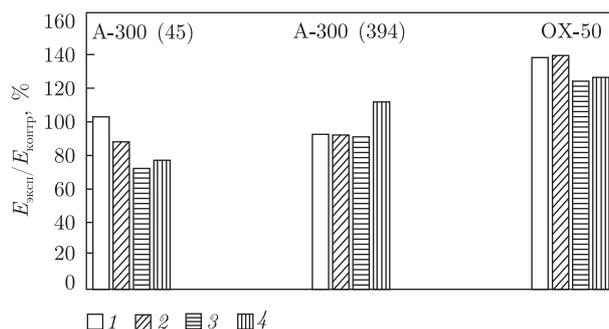


Рис. 2. Зависимость энергии движения деконсервированных гамет быка в присутствии разных форм кремнезема от их концентрации, %: 1 — 0,0025; 2 — 0,01; 3 — 0,004; 4 — 0,16

преимущественно из субмикронных слабоагломерированных агрегатов. При одинаковой навеске кремнезема количество наночастиц уменьшалось в ряду А-300 (45) > А-300 (394) > ОХ-50.

В качестве клеточного материала применяли деконсервированные гаметы быка, которые доставляли в лабораторию в замороженном состоянии из Национального банка генофонда животных. Их размораживание проводили в 2,9%-м растворе цитрата натрия в соответствии с методикой, описанной ранее [11]. Кремнеземы добавляли к содержащей гаметы ЛГЖ-среде (лактозо-глицериножелточная среда), таким образом, чтобы их массовая концентрация была в диапазоне от 0,0025 до 0,6700%. Контроль за жизнедеятельностью гамет осуществляли методом лазерно-корреляционной спектроскопии (ЛКС) по суммарной энергии различных мод движения клеток (энергии движения — $E = E_{\text{эксп}}/E_{\text{контр}}$) в соответствии с методикой, приведенной в статье [12].

Спектры ЯМР записывали на ЯМР-спектрометре высокого разрешения (Varian 400 Mercury) с рабочей частотой 400 МГц. Методика проведения экспериментов подробно описана ранее [7]. Визуализацию суспензий, содержащих клетки и кремнезем, проводили методом фазово-контрастной микроскопии.

Результаты и их обсуждение. Концентрационные зависимости энергии движения клеток при добавлении к их суспензии разных форм кремнезема, демонстрирует рис. 2, а микрофотографии этих образцов — рис. 3.

Результаты сравнительных исследований, выполненные методом ЛКС, свидетельствуют о том, что каждый из указанных кремнеземов в зависимости от концентрации проявляет разную биологическую активность по отношению к гаметам быка. При этом зависимость энергии движения клеток от концентрации SiO_2 наиболее сильно проявляется для А-300 (45). Для него максимальная (не на много большая, чем для контрольного образца) величина E регистрируется при наименьшей концентрации кремнезема (C_{SiO_2}). С увеличением C_{SiO_2} энергия движения уменьшается, что подтверждает взаимодействие наночастиц кремнезема с клетками и, возможным ингибированием процессов клеточного метаболизма. Для уплотненного кремнезема при $0,0025 \leq C_{\text{SiO}_2} \leq 0,04\%$ по массе имеет место небольшое понижение двигательной активности гамет, а при $C_{\text{SiO}_2} = 0,016\%$ по массе — ее рост. В присутствии нанокремнезема ОХ-50 увеличение величины E фиксируется во всем диапазоне изменения C_{SiO_2} .

Рассчитанные в соответствии с методикой [7] температурные зависимости концентрации незамерзающей воды $C_{\text{н.в}}$, изменения межфазной энергии Гиббса (ΔG) от $C_{\text{н.в}}$ и распреде-

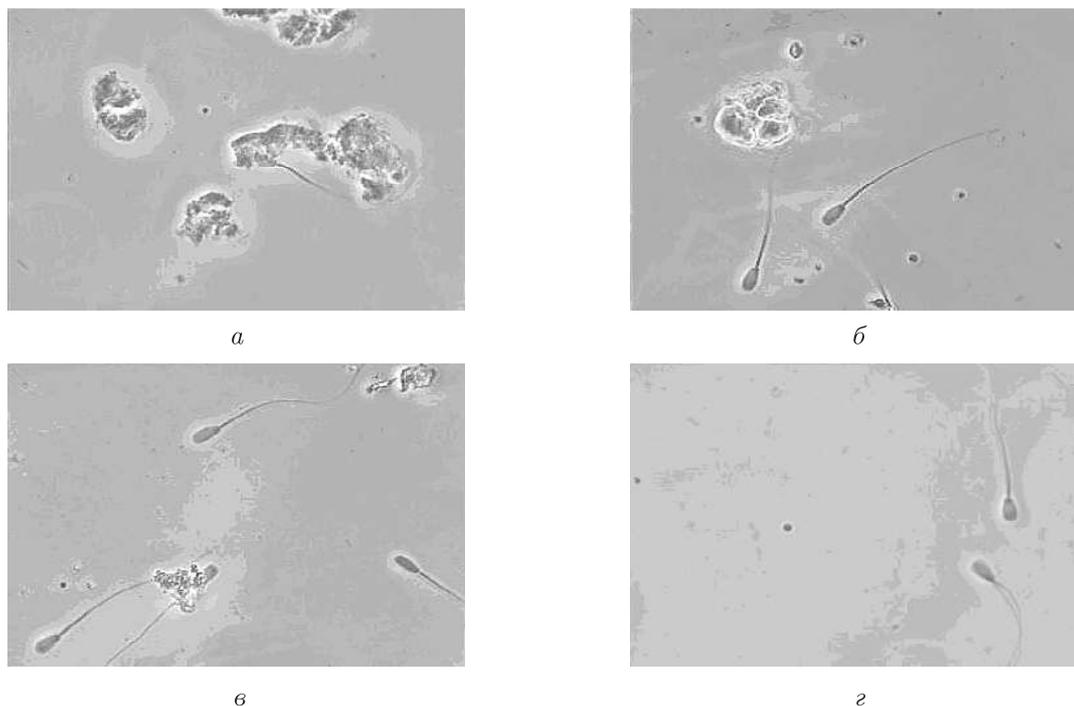


Рис. 3. Деконсервированные гаметы быков в присутствии разных форм кремнезёмов: а — А-300 (45) ($C_{\text{SiO}_2} = 0,04\%$); б — А-300 (394) ($C_{\text{SiO}_2} = 0,04\%$); в — ОХ-50 ($C_{\text{SiO}_2} = 0,03\%$); г — контроль (клетки без добавления кремнезёмов)

ление по радиусам кластеров межфазной воды иллюстрирует рис. 4. Перегибы на зависимостях $C_{\text{н.в.}}(T)$ и $\Delta G(C_{\text{н.в.}})$, наблюдающиеся при 260 К ($\Delta G \approx 0,5$ кДж/моль), разделяют области, отвечающие сильно- и слабосвязанной воде [7]. Термодинамические характеристики слоев сильно- (s) и слабосвязанной (w) воды (соответственно верхние индексы), адсорбированной различными нанокремнеземами, приведены в табл. 1.

Таблица демонстрирует значения параметров гидратации, отнесенные к единице поверхности и единице массы используемых адсорбентов. Для разных нанокремнезёмов эти величины могут сильно различаться вследствие существенных отличий в удельной поверхности ОХ-50 ($52 \text{ м}^2/\text{г}$) и А-300 ($330 \text{ м}^2/\text{г}$). По отношению к единице массы адсорбента минимальное значение концентрации слабо- и сильносвязанной воды, соответственно и межфазной энергии (γ_s), фиксируется для ОХ-50, а максимальное значение — для А-300 (45). Причем при варьировании типа кремнезема $C_{\text{н.в.}}^s$ может изменяться более чем на порядок, а $C_{\text{н.в.}}^w$ — в 2–3 раза. Для концентраций, отнесенных к единице площади поверхности, указанных изменений становятся существенно меньше. Более того, минимальные значения $C_{\text{н.в.}}^s$ и $C_{\text{н.в.}}^w$ наблюдаются для образца А-300 (394).

Таблица 1

Нано-кремнезём	$C_{\text{H}_2\text{O}}$, г/г	$C_{\text{н.в.}}^s$, мг/г (мкмоль/м ²)	$C_{\text{н.в.}}^w$, мг/г (мкмоль/м ²)	ΔG^s , кДж/моль	ΔG^w , кДж/моль	γ_s , Дж/г (мДж/м ²)
ОХ-50	5,6	17 (18,9)	387 (430)	−1,6	−0,6	4,4 (88)
А-300 (45)	3,0	200 (37,0)	1100 (204)	−3,0	−0,5	29,2 (97)
А-300 (394)	1,0	100 (18,5)	900 (167)	−3,0	−0,7	18 (60)

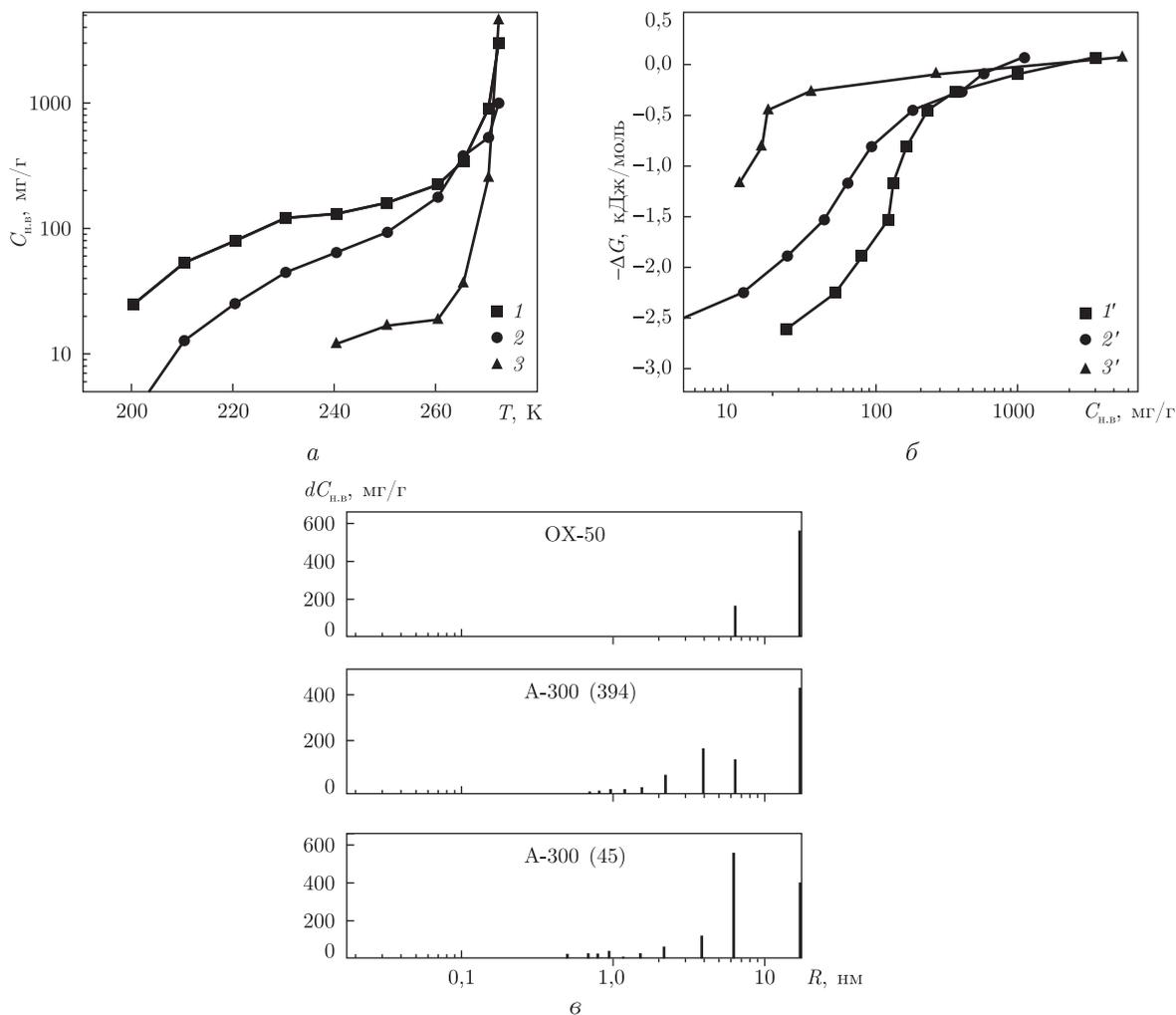


Рис. 4. Зависимости: *a* — концентрации незамерзающей воды от температуры; *б* — изменения свободной энергии Гиббса от концентрации незамерзающей воды [кривые: 1, 1' — А-300 (45); 2, 2' — А-300 (394); 3, 3' — ОХ-50]; *в* — распределения по радиусам кластеров межфазной воды для смоченных водой порошков кремнезема А-300 с разной плотностью и 18% суспензии кремнезема ОХ-50

При анализе полученных результатов следует учитывать, что все нанокремнеземы агрегированы, но агрегированность первичных частиц уменьшается с увеличением их размеров. С ростом агрегированности снижается площадь поверхности, доступной для контактных взаимодействий с другими частицами или клетками, поскольку для таких протяженных объектов, как клетки (размером в несколько микрон или более) будет доступна только внешняя поверхность агрегатов. Чем больше размер агрегатов (агломератов) кремнезема и меньше их плотность, тем большая часть связанной воды находится во внутренних полостях и не подвержена изменениям при контактных взаимодействиях с клетками. С другой стороны, большой размер агрегатов обеспечивает лучшие условия для формирования многоцентровых комплексов с протяженными объектами, к которым относятся и репродуктивные клетки (см. рис. 3).

На распределениях $dC_{н,в}(R)$, полученных в соответствии с уравнением Гиббса–Томсона [7], к сильно связанной воде относятся кластеры с радиусом (R) < 2 нм. Большинство

таких кластеров локализовано во внутреннем объеме агрегатов наночастиц кремнезема. Основная часть воды, связанной с наночастицами кремнезема ОХ-50, входит в состав доменов при $R = 16$ нм (см. в на рис. 4). Структурные свойства такой воды близки к свойствам объемной воды, и потому при контакте клетка — частица изменения свободной энергии связанной воды относительно невелики. Максимум распределения $dC_{н.в.}(R)$ при $R = 16$ нм наблюдается и для уплотненного нанокремнезема А-300 (394). Учитывая, что сильносвязанная вода (входящая в состав кластеров при $R < 2$ нм) сосредоточена преимущественно во внутреннем объеме агрегатов, можно считать, что наружная часть гидратных оболочек уплотненных агрегатов А-300 (394) мало отличается от таковых для нанокремнезема ОХ-50. Для нанокремнезема А-300 (45) максимум распределения $dC_{н.в.}(R)$ наблюдается при $R = 6,6$ нм. Изменения свободной энергии Гиббса в таких доменах существенно выше. Соответственно, контактные взаимодействия с клетками могут требовать большей энергии перестройки гидратных оболочек как клеток, так и агрегатов наночастиц кремнезема.

Можно предположить, что биологическая активность кремнезема по отношению к гаметам определяется двумя факторами, противоположным образом влияющими на процессы клеточного метаболизма. Кратковременный контакт клетка — частица стимулирует двигательную активность гамет, вероятно, вследствие взаимодействий с рецепторной системой клеток. Формирование стабильных многоцентровых комплексов наночастиц и их агрегатов с клетками подавляет двигательную активность гамет и, возможно, метаболические процессы вследствие ухудшения условий массообмена с окружающей средой.

Поскольку сильносвязанной является вода, заполняющая полости небольшого размера (зазоры между первичными частицами кремнезема в агрегатах) или непосредственно контактирующая с активными центрами поверхности [7], значительная ее часть локализована во внутреннем пространстве агрегатов кремнезема. Минимальное количество такой воды содержится в слабо агрегированном нанокремнеземе ОХ-50. Соответственно большая часть поверхности его частиц доступна для взаимодействий с гаметами. Но размеры агрегатов ОХ-50 небольшие, что не способствует формированию с клетками прочных, многоцентровых комплексов. В результате наблюдается стимулирование двигательной активности клеток во всем диапазоне концентраций ОХ-50.

Обратная ситуация наблюдается для нанокремнезема А-300 (45). Для него характерно большое количество сильносвязанной воды, что свидетельствует о небольшой площади поверхности, доступной для контактных взаимодействий. Однако большая величина агрегатов кремнезема способствует формированию стабильных многоцентровых адсорбционных комплексов клетка — агрегаты частиц, что проявляется в виде ингибирования двигательной активности гамет.

Промежуточная ситуация реализуется для нанокремнезема А-300 (394). Его агрегаты/агломераты имеют высокую плотность при практически том же среднем размере первичных наночастиц, что и А-300 (45). Поэтому объем сильносвязанной воды в суспензии для А-300 (394) меньше, чем для А-300 (45). Частота кратковременных контактных взаимодействий с гаметами для сильно агрегированного нанокремнезема А-300 (394) меньше, чем для менее агрегированного ОХ-50. Однако многоцентровые комплексы агрегатов А-300 (394) с клетками более стабильны.

Таким образом, совокупность полученных экспериментальных результатов доказывает, что для нанокремнезема основной стадией, ответственной за стимулирование двигательной активности гамет, служит формирование точечных контактов между клетками и час-

тицами. Формирование стойких комплексов клетка — агрегат наночастиц (агломинация) препятствует двигательной активности клеток и приводит к замедлению процессов клеточного метаболизма.

Авторы выражают благодарность канд. хим. наук Е. Ф. Воронину за предоставленный образец уплотненного кремнезема.

Работа выполнена при поддержке Международного гранта 7 Европейской рамочной программы (FP7-IRSES “Compositum”), Marie Curie Action, PEOPLE, International Research Staff Exchange Scheme (IRSES).

1. *Медицинская химия и клиническое применение диоксида кремния / Под ред. А. А. Чуйко. — Киев: Наук. думка, 2003. — 415 с.*
2. *Вильцанюк А. А., Геращенко И. И. Энтеросорбция в комплексном лечении острых хирургических заболеваний органов брюшной полости. — Харьков: Ома-Пак, 2009. — 128 с.*
3. *Палий Г. К., Чесноков А. А. Исследование взаимодействия микроорганизмов с дисперсным кремнеземом // Кремнеземы в медицине и биологии / Под ред. А. А. Чуйко. — Киев-Ставрополь: ИФП “Ставрополье”, 1993. — С. 206–212.*
4. *Курдиш Й. К., Цимберг Е. А., Бихтунов В. Л. та ін. Вплив дисперсних кремнеземів на ріст дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* // Микробиол. журн. — 1991. — **53**, № 2. — С. 41–44.*
5. *Крупська Т. В., Барвінченко В. М., Григор'єва М. А. та ін. Дослідження процесів життєдіяльності та росту біомаси одноклітинних мікроорганізмів за наявності високодисперсного кремнезему і модифікованих кремнеземів // Фарм. журн. — 2008. — № 1. — С. 95–101.*
6. *Курдиш Й. К., Чуйко А. А. Особенности взаимодействия микроорганизмов с высокодисперсным кремнеземом // Медицинская химия и клиническое применение диоксида кремния / Под ред. А. А. Чуйко. — Киев: Наук. думка, 2003. — С. 153–164.*
7. *Гулько В. М., Туров В. В., Горбик П. П. Вода на межфазной границе. — Киев: Наук. думка, 2009. — 694 с.*
8. *Крупская Т. В., Турова А. А., Гулько В. М., Туров В. В. Влияние высокодисперсных материалов на физиологическую активность дрожжевых клеток // Биополимеры и клетка. — 2009. — **25**, № 4. — С. 290–297.*
9. *Крупская Т. В., Барвінченко В. Н., Туров В. В. Изучение природы воздействия нанокремнезема на клеточные объекты // Химия, физика и технология поверхности: Межвед. сб. науч. тр. — Київ: Наук. думка, 2008. — Т. 14. — С. 511–523.*
10. *Gun'ko V. M., Voronin E. F., Nosach L. V. et al. Structural, textural and adsorption characteristics of nanosilica mechanochemically activated in different media // J. Colloid. and Interface Sci. — 2011. — **355**. — P. 300–311.*
11. *Курбатов А. Д., Платов Е. М., Корбан Н. В., Мороз Л. Г. Крיוконсервація сперми сільськогосподарських тварин. — Ленінград: Агропромиздат, Ленінград. отд-ня, 1988. — 256 с.*
12. *Галаган Н. П., Власенко В. В., Настасієнко Н. С., Чуйко О. О. Дослідження впливу високодисперсного кремнезему, модифікованого поліолами, на життєздатність репродуктивних клітин методом фотон-кореляційної спектроскопії // Вісн. Харк. ун-ту. Біофіз. вісн. — 2005. — **1** (15), № 665. — С. 94–98.*

*Институт химии поверхности
им. А. А. Чуйко НАН Украины, Киев
Институт разведения и генетики животных
НААН Украины, с. Чубинское Киевской области*

Поступило в редакцию 11.11.2011

Н. П. Галаган, В. М. Гунько, Н. Г. Порхун, О. А. Новікова, В. В. Туров

Вплив дисперсності нанокремнеземів на їх біоактивність по відношенню до гамет бика

Методом лазерно-кореляційної спектроскопії (ЛКС) вивчено вплив різних модифікацій нанокремнезему на рухливість гамет бика. Результати досліджень методом ЛКС зіставлено з даними методу низькотемпературної ^1H ЯМР-спектроскопії про будову гідратних оболонок наночастинок кремнеземів. Отримані результати свідчать про активування рухливості (максимальної для нанокремнезему ОХ-50) при короткочасному контакті клітина – частинка. Інгибування рухливості відбувається при формуванні довгоіснуючих багатоцентрових комплексів клітина – наночастинка.

N. P. Galagan, V. M. Gun'ko, N. G. Porkhun, T. A. Novikova, V. V. Turov

Influence of the dispersity of nanosilicas on their bioactivity in respect to bovine gametes

The effects of different nanosilicas on the mobility of bovine gametes are studied using the photon correlation spectroscopy (PCS). The PCS study results are compared with the data of the ^1H NMR spectroscopy study of the structure of hydrate shells of silica particles. The obtained results suggest the activation of the gamete mobility (maximal for silica OX-50) during short term contacts between cells and particles. The inhibition of the gamete mobility occurs due to the formation of long-living multicentered complexes of cells and particles.