УДК 576:579.22:616-092

МЕМБРАНОТРОПНИЙ ВПЛИВ НАНОЧАСТИНОК АУРУМУ ТА АРГЕНТУМУ НА ІНТЕНСИВНІСТЬ ОКИСНЮВАЛЬНИХ ПРОЦЕСІВ У КЛІТИНАХ ESCHERICHIA ЗА УМОВ ЇХ ЛІОФІЛІЗАЦІЇ/РЕГІДРАТАЦІЇ

М. Є. Романько

ННЦ «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини»

Встановлено, що процеси ліофілізації/регідратації впливають гальмуючим чином на інтенсивність процесів перекисного окиснювання ліпідів (№ 25, 20) та посилюючим — на окиснювання білків (№ 25, 24, 20) у мембранах регідратованих клітин E. coli у порівнянні зі станом цих процесів у нативних клітин ($p \le 0,05$). При цьому у мембранах клітин досліджених штамів реєстрували виражену інгібіцію активності каталази, зниження значень активності якої складало у середньому від 32,2 % до 77,9 %, та зростанням рівня показника загальної АОА у середньому на 91,9 % ($p \le 0,05$).

За умов контактної взаємодії з наночастинками ауруму (Au) розміром ~30 нм і ~45 нм та аргентуму (Ag) розміром ~30 нм регуляторні механізми окиснювальних процесів у мембранах клітин E. coli у цілому характеризуються втручанням реакцій загальної АОА, змінами активності каталази та гальмуванням утворення похідних окиснювання білків, що може обумовлювати потенціал клітин досліджених штамів щодо їх резистентності при дії стресорних чинників. Доведено, що потенціалу власної антиокиснювальної системи мембран ліофілізованих клітин E. coli штамів № 20 і 24 виявилось недостатнім для зберігання нативної структури ліпідів мембрани та запобігання впливу АМК навіть після інкубації з наночастинками Au розміром ~30 нм.

Різноспрямовані зміни визначених показників у мембранах E. coli різних штамів є беззаперечним фактом індивідуального специфічного характеру впливу нанопрепаратів на функціональний стан клітин у межах одного виду. За підсумком одержаних результатів встановлено, що при взаємодії нанопрепаратів з клітинами E. coli різних штамів не реєстрували залежності характеру їх впливу від обраного діапазону концентрацій.

Ключові слова: КЛІТИНА, ЛІОФІЛІЗАЦІЯ/РЕГІДРАТАЦІЯ, МЕМБРАНА, НАНОЧАСТИНКИ МЕТАЛІВ, ОКИСНЮВАЛЬНА МОДИФІКАЦІЯ БІЛКІВ, ПЕРЕКИСНЕ ОКИСНЮВАННЯ ЛІПІДІВ

Стрімкий розвиток сучасних технологій синтезу наночастинок різноманітної природи дозволив значно розширити межі їх застосування у різних галузях промисловості та медицини [1–4]. Якісно новий рівень протидії інфекційним захворюванням може бути забезпечено за рахунок застосування новітніх нанобіотехнологій і наноматеріалів. Разом з цим, інформація щодо біологічних ефектів наночастинок є досить обмеженою. Визначення особливостей модуляції наночастинками біохімічних процесів біосистем різного рівня організації відкриває нові перспективи у фундаментальному розумінні їх впливу на стан та функціональну активність клітин [2–8].

Довготривале гарантоване збереження та підвищення ефективності виробничих штамів мікроорганізмів є актуальною проблемою як при підтриманні колекційних зразків таких культур у депозитаріях, так і у процесах промислового виробництва ветеринарних імунобіологічних препаратів (ВІП). Ліофілізація відноситься до одного з найбільш ефективних методів довготривалого збереження клітин бактерій. Згідно з ISO 13408–3 [9], ефективність ліофілізації/регідратації значною мірою залежить не тільки від умов

проведення процесу. Екстремальний вплив багатьох негативних факторів, якого зазнає клітина у процесі ліофілізації, у більшості випадків призводить до запуску фізико-хімічних процесів, які мають спільні риси із процесами старіння та можуть виявитися летальними для клітини [10].

Відомо, що цитоплазматична мембрана ушкоджується у першу чергу, так як вона є однією з основних мішеней екстремальної дії [11]. Активні метаболіти кисню (АМК), утворені у стресованій клітині, у великих концентраціях можуть модифікувати макромолекули та приводить до її деструктивних змін, а в низьких — їм властиво виконувати сигнальні функції. Тому, навіть, відносно невеликі кількості АМК будуть впливати на експресію генів, репараційні, метаболічні та біосинтетичні процеси [12–14].

Важливим стартовим чинником запуску механізмів як окиснювання білків, так й ліпідів, є радикали O_2 та інші АМК. У зв'язку з тим, що білки і ліпіди входять до клітинних мембран як структурні елементи, їх ураження приводить до порушення регуляції хімізму та проникливості живої клітини, а також руйнування її мембрани, а в подальшому — до її загибелі. Наприклад, зміна вмісту ненасичених жирних кислот у мембрані впливає на ступінь текучості її ліпідних компонентів, отже, на інтенсивність процесів ліпопероксидації тощо, у результаті чого вона в подальшому втрачає резистентність щодо низькотемпературної та іншої дії [10, 15].

Основним напрямком у технології одержання активованих форм мікроорганізмів є оптимізація та модифікування умов їх культивування шляхом уведення речовин, які вибірково стимулюють ріст та інші показники біологічної активності клітин як на стадії промислового виробництва ВІП, так й при підтриманні та зберіганні клітин у життєздатному стані. Отже, пошук речовин, які здатні виявляти протекторну дію та стимулювати фізіолого-біохімічні показники виробничих штамів мікроорганізмів за умов технологічного стресу, є актуальним завданням [10].

Дослідження впливу наночастинок металів на функціональний стан бактерій, виконані раніше [3, 4], свідчать про можливість контролювання та регулювання інтенсивності їх фізіолого-біохімічних реакцій. Так, виявляються ефективні розмірні та концентраційні діапазони нанопрепаратів, в яких спостерігається або виражена стимуляція усіх показників життєдіяльності клітини, або є наявним їх значне пригнічення [16, 17].

Тому метою нашої роботи було вивчення характеру впливу наночастинок ауруму та аргентуму в діапазоні розмірів на мембранні процеси нативних та регідратованих (ліофілізованих) клітин *Escherichia coli* виробничих штамів.

Матеріали і методи

У роботі використовували нативні та регідратовані (ліофілізовані) клітини *E. coli* виробничих штамів №№ 20, 24 і 25, які підтримують і зберігають у ліофілізованому вигляді в колекції Національного центру штамів мікроорганізмів ДНКІБШМ (м. Київ).

Ізольовані культури *E. coli* дослідних штамів культивували на відповідних поживних середовищах: рідкому — м'ясо-пептонному бульйоні (МПБ) та щільному — м'ясо-пептонному агарі (МПА), оптимальних для накопичення бактеріальної маси. Вирощені на щільних середовищах культури мікроорганізмів контролювали за тестами, рекомендованими для відповідного виду бактерій. Відібрані колонії після двократного пасажу 4–6 год за температури (37±1) ºС у рідкому поживному середовищі висівали на агаризоване поживне середовище і культивували за температури (37±1) ºС впродовж 15–18 год з подальшим змиванням клітин стерильним фізіологічним розчином хлориду натрію (pH (7,0–7,2)).

Деліофілізацію/регідратації (відновлення життєздатності клітин штамів) *E. coli* проводили за наступною схемою: у флакони з ліофілізованою біомасою вносили МПБ, який додатково містив 5 % печінкової води, 2 % поживного середовища № 199 та 1 % глюкози; культивували протягом 24 год за температури (37±1) ºС; пересівали одержані

добові культури кожного штаму на аналогічне напіврідке агаризоване середовище; культивували протягом 24 год за температури (37±1) ºС.

Наночастинки металів отримували конденсаційними методами шляхом відновлення відповідних солей металів у водному середовищі придатним відновлювачем, що передбачає спеціальний температурний режим і застосування стабілізаторів для утворення стійких гідрозолів [18]. Розмір отриманих частинок було обчислено з використанням методу лазерно-кореляційної спектрометрії (ЛКС), проводячи вимірювання на лазерно-кореляційному спектрометрі Zetasizer-3 («Malvern Instruments Ltd», Великобританія) [19].

У роботі було використано наночастинки Au із середнім розміром ~20 нм, ~30 нм і ~45 нм та Ag із середнім розміром ~30 нм. Вихідна концентрація Au у колоїдній дисперсії золю складала 38,6 мкг/мл за металом з подальшим її розведенням до концентрацій 1,16 мкг/мл за металом відповідно. Вихідна концентрація Ag у колоїдній дисперсії золю складала 86,4 мкг/мл за металом з подальшим її розведенням до концентрацій 2,59 мкг/мл за металом відповідно.

Електронно-мікроскопічний аналіз розподілу наночастинок Au у тест-клітинах здійснювали за допомогою електронного мікроскопу JEOL JEM-1230 Electron Microscope («Tokyo Boeki Ltd», Японія). Візуалізацію взаємодії клітин *E. coli* з наночастинками Au проводили методом конфокальної мікроскопії (LSM 510 META «Carl Zeiss», Німеччина).

Фракції плазматичних мембран (ПМ) клітин одержували методом диференційного центрифугування [16]:

Для нативних клітин: клітини змивали з поверхні чашок середовищем А наступного складу: 0,25 М сахароза, 25 мМ Трис-HCl, 2 мМ ЕДТА (pH=7,4). Ресуспендували клітини у середовищі А, суспензію обробляли ультразвуком із охолодженням впродовж 3 хв (6×30 сек); осаджували мембрани центрифугуванням при 6000 об/хв протягом 15 хв; осад (сумарна фракція ПМ) ресуспендували у середовищі зберігання Б наступного складу: 20 мМ Трис-HCl+3 мМ $MgCl_2$ (pH=7,4). Сумарну фракцію ПМ зберігали за температури мінус (20±1) ºС; повторного заморожування не допускали.

Для ліофілізованих клітин: регідратацію ліофілізата проводили у фізіологічному розчині натрію хлориду миттєво. Після процедури регідратації клітини осаджували при 6000 об/хв протягом 5 хв. Осад ресуспендували у розчині натрію хлориду та повторно осаджували при 6000 об/хв протягом 5 хв; ресуспендували у середовищі А та осаджували при 6000 об/хв протягом 5 хв. Осад повторно ресуспендували у середовищі А та отриману суспензію обробляли ультразвуком із охолодженням 3 хв (6×30 сек); осаджували мембрани центрифугуванням при 6000 об/хв протягом 15 хв; осад (сумарна ПМ) ресуспендували у середовищі зберігання Б. Сумарну фракцію ПМ зберігали за температури мінус (20±1) ºС; повторного заморожування не допускали.

Для стандартизації препаратів ПМ проводили визначення білка за методом Лоурі в модифікації Miller G. L. (1959) [20].

У ПМ відмитих нативних та деліофілізованих клітин досліджували інтенсивність процесів перекисного окиснювання ліпідів (ПОЛ) за визначенням концентрації дієнових кон'югатів (ДК) і малонового діальдегіду (МДА) у гептан-ізопропанольних екстрактах з використанням модифікованої методики В. Б. Гаврилової і М. І. Мішкорудної (1985) [21]; інтенсивність окиснювальної модифікації білків (ОМБ) у ПМ визначали за утворенням карбонільних альдегідо- і кетопохідних нейтрального (НХ) і основного характеру (ОХ) за Арчаковим О. І. і Михосоєвим І. М. (1998) [22].

Стан антиокиснювальної системи (АОС) визначали за активністю ферменту каталази (КФ 1.11.1.6) з використанням H_2O_2 спектрофотометрично за довжини хвилі 410 нм [23]. Загальну антиокиснювальну активність (АОА) ліпідів, екстрагованих із клітин бактерій та їх сумарних мембранних фракцій, визначали, як описано в роботі Клебанова Г. І. (1988) [24].

Оцінку впливу наночастинок металів на біохімічні показники у ПМ бактеріальних клітин проводили шляхом преінкубації протягом 2–3 хв 67 мкл препарату ПМ з 33 мкл наночастинок металу. В контрольну пробу (контроль) замість наночастинок металу додавали 20 мМ *Трис-HCl* буфер.

Контролем слугували препарати ПМ нативних і деліофілізованих клітин *E. coli* без додавання наночастинок металу.

Статистичну обробку результатів проводили згідно з [25] з використанням критерію Ст'юдента ($p<0,05$).

Результати й обговорення

З метою дослідження впливу нанопрепаратів на біохімічні показники клітин *E. coli* різних штамів з використанням конденсаційного методу було синтезовано золі Au із середнім розміром частинок ~20 нм, ~30 нм і ~45 нм та Ag із середнім розміром частинок ~30 нм**.** Розмір отриманих частинок обчислено за методом лазерно-кореляційної спектрометрії (ЛКС). На рисунку 1 (А, Б) наведені дані ЛКС з визначення середнього розміру ~30 нм і ~45 нм наночастинок Au.

Розмір одержаних наночастинок також було візуалізовано за методом трансмісійної електронної мікроскопії (рис. 2), що дає підставу зазначити кореляцію отриманих різними методами даних щодо визначення основних фізико-хімічних показників наночастинок ауруму — розміру і форми.

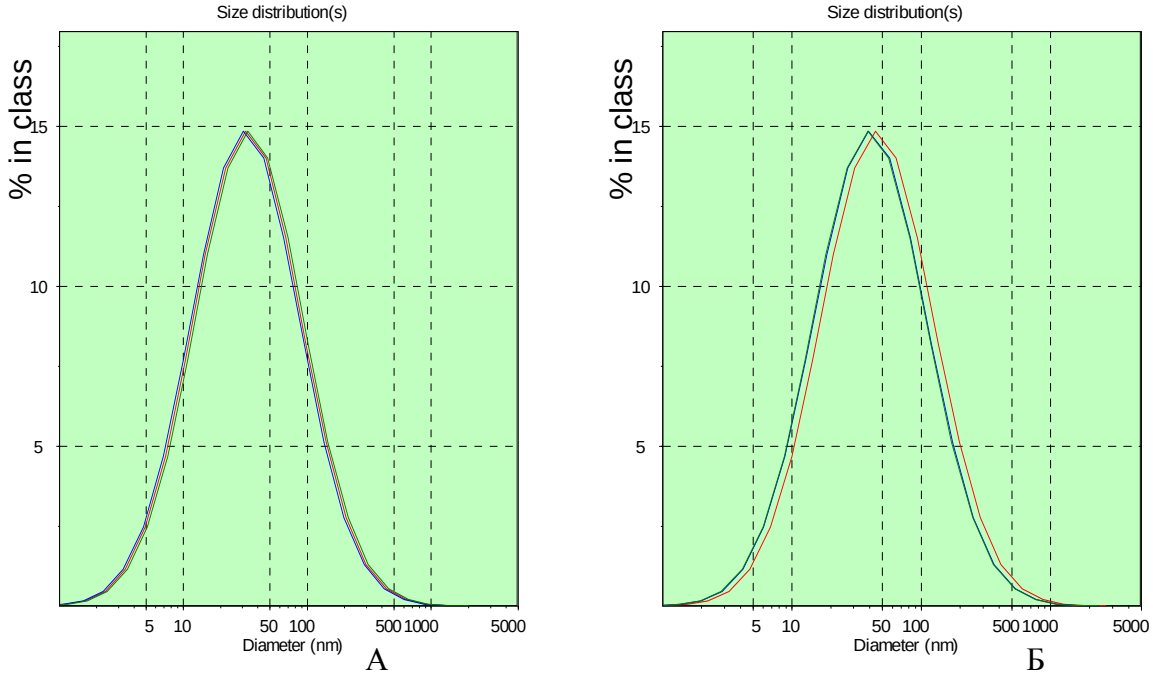

Рис. 1. Розподіл за гідродинамічним діаметром наночастинок ауруму середнього розміру ~30 нм (32,8±1,3 нм) і ~45 нм (45,2±0,4 нм) (*дані ЛКС*)

Методом конфокальної скануючої лазерної мікроскопії було зареєстровано підтвердження контактної взаємодії бактеріальних клітин з наночастинками ауруму. На рисунку 3 на прикладі клітин штаму *E.coli* № 25 та наночастинок ауруму середнього розміру ~30 нм і ~45 нм наведено типові дані, що відображають взаємодію клітин *E. coli* з наночастинками досліджених нанопрепаратів.

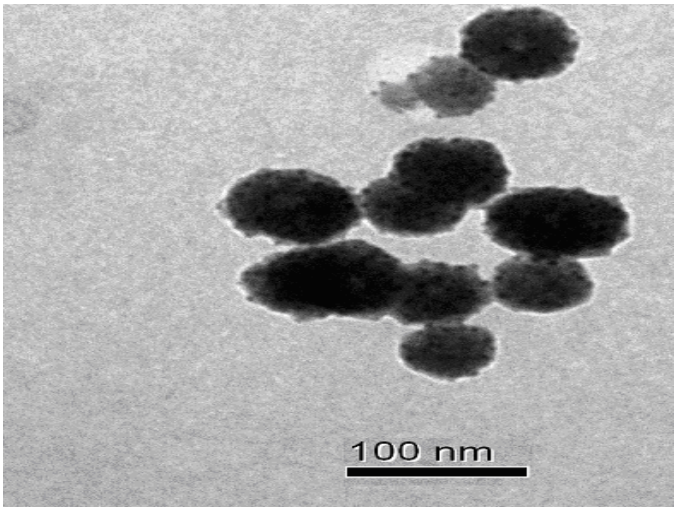

Рис. 2. Наночастинки ауруму середнього розміру ~45 нм (дані трансмісійної електронної мікроскопії (трансмісійний електронний мікроскоп JEM-1230, «JEOL»))

Зміни інтенсивності забарвлення (від червоного до синього) відображають локалізацію наночастинок ауруму в бактеріальній клітині і свідчать про неоднорідність розподілення їх на поверхні та всередині бактерії із переважною їх локалізацією поблизу одного з кінців клітини. Це може бути наслідком структурної та/або фізіологічної гетерогенності клітини та співпадає із даними, отриманими для інших типів прокаріотичних клітин за умов їх контакту з наночастинками ауруму.

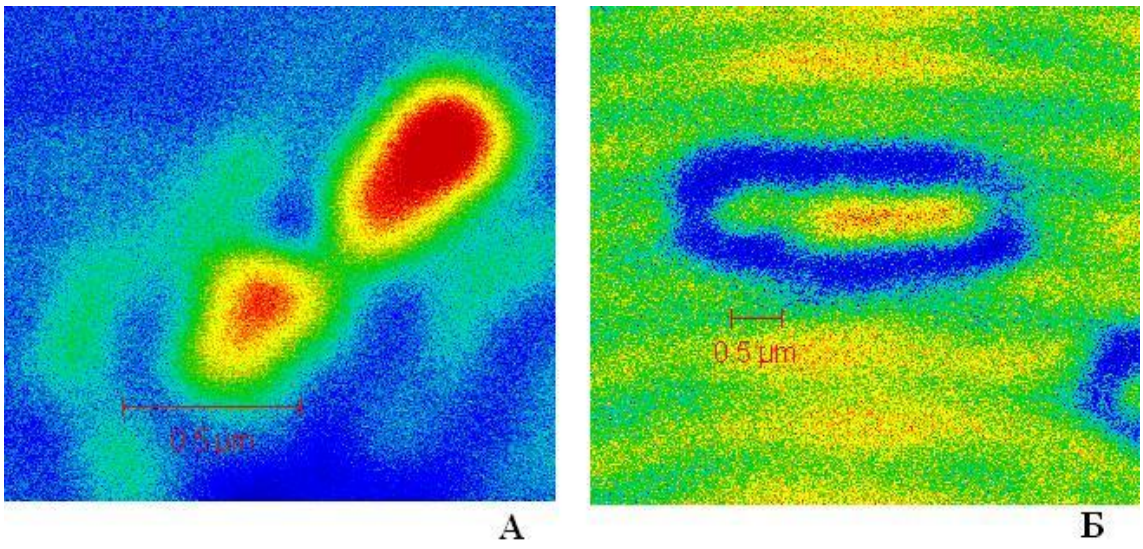

Рис. 3. Контактна взаємодія клітин *E. coli* штаму № 25 з наночастинками ауруму середнього розміру ~30 нм (А) і ~45 нм (Б) за даними конфокальної мікроскопії (LSM 510 META Carl Zeiss, лазер 543 нм, відбиття 530–540 нм)

Аналіз впливу процесів ліофілізації/регідратації на клітини *E. coli* досліджених штамів виявив виражені різноспрямовані зміни інтенсивності процесів ПОЛ за рівнем утворення його продуктів у їх плазматичних мембранах (табл. 1).

Так, для мембран регідратованих клітин штамів № 25 і 20 спостерігали гальмування процесів ПОЛ порівняно з їх інтенсивністю у нативних клітин відповідних штамів. Зниження рівня ДК у мембранах ліофілізованих клітин штамів № 25 і 20 складало 39,7 % і 17,5 % ($p \leq 0,05$) відповідно, а МДА — 30,6 % і 18,2 % ($p \leq 0,05$) відповідно.

Таблиця 1

Інтенсивність процесів перекисного окиснювання ліпідів у плазматичних мембранах нативних

і ліофілізованих/регідратованих клітин *E. coli* різних штамів (M±m; n=5)

Фракції ПМ штаму	Нативні клітини		Ліофілізовані клітини	
	ДК, мкмоль/л	МДА, ΔD	ДК, мкмоль/л	МДА, ΔD
E. coli № 25	54,40±1,45	7,20±0,52	32,80±3,15*	5,00±0,25*
E. coli № 24	23,60±0,65	3,20±0,09	26,80±1,00*	3,80±0,15*
E. coli № 20	30,80±2,05	4,40±0,25	25,40±2,80	3,60±0,15

Примітка: (тут і у наступних таблицях) * — різниця значень вірогідна при ($p \leq 0,05$) відносно значень такого показника у ПМ нативних клітин

Для клітин штаму № 24 після ліофілізації кількість ДК і МДА вірогідно зростала на 13,6 % і 18,8 % відносно їх рівня у ПМ нативних клітин. Таким чином, одержані дані вказують на різноспрямованість впливу процесу ліофілізації/регідратації на стан клітин *E. coli* в межах одного виду мікроорганізмів.

З результатів досліджень, наведених у таблиці 2, виявляється, що за рівнем похідних ОМБ нейтрального (НХ) і основного (ОХ) характеру в мембранах бактеріальних клітин дослідних штамів встановлено посилення інтенсивності окиснювання білків відносно такої для контроля нативних клітин.

Таблиця 2

Інтенсивність процесів окислювальної модифікації білків у плазматичних мембранах нативних і ліофілізованих/регідратованих клітин *E. coli* різних штамів (M±m; n=5)

Фракції ПМ штаму	Нативні клітини		Ліофілізовані клітини	
	НХ, ммоль/г білка	ОХ, ммоль/г білка	НХ, ммоль/г білка	ОХ, ммоль/г білка
E. coli № 25	4,166±0,200	2,976±0,120	11,400±2,150*	6,000±0,310*
E. coli № 24	1,300±0,180	0,800±0,004	1,96±0,10*	1,12±0,04*
E. coli № 20	3,20±0,08	1,43±0,04	4,28±0,20*	2,44±0,08*

Так, зростання рівня похідних НХ у мембранах ліофілізованих клітин штамів № 25, 24 і 20 складало у середньому — 173,6 %, 50,8 % і 33,8 % ($p \leq 0,05$), а ОХ — 101,6 %, 40,0 % і 70,6 % ($p \leq 0,05$) відповідно.

У зв'язку з тим, що утворення продуктів окиснювання білків може приводить до їх швидкого розкладання і деструкції, саме карбоніли ОМБ є первинним маркерами білкового окиснювання [26]. Відомо, що деградовані протеїни можуть знаходиться в клітинах годинами і навіть днями, а продукти ПОЛ піддаються детоксикації вже через декілька хвилин [27]. Одержані дані дозволяють розглядати окиснювання протеїнів як відносно стабільні показники окиснювального стресу, що має величезне значення для дослідницької практики. Тому, що важливим стартовим чинником запуску механізмів як окиснювання білків, так й ліпопероксидації, є радикали O_2, можна припустити визначальну роль антиокиснювальної системи в захисті мембран досліджуваних клітин не лише як регуляторну, а й як прогностичну [28].

Так, було визначено рівень показників, що характеризують стан як ферментативної ланки, так й загального ендогенного потенціалу АОС мембран клітин. Процеси ліофілізації/регідратації приводили до вираженої інгібіції активності каталази у мембранах досліджених штамів (табл. 3). Вірогідне зниження її значень для штамів № 25, 24 і 20 складало у середньому 77,9 %, 43,4 % і 32,2 % відповідно. Одержані результати узгоджуються з даними Кенії М. В. і спів. [29] щодо надмірного утворення карбонільних похідних на фоні різкого падіння активності каталази та зростання рівня активності супероксиддисмутази.

Таблиця 3

Стан показників антиокиснювальної системи у плазматичних мембранах нативних

і ліофілізованих/регідратованих клітин *E. coli* різних штамів (M±m; n=5)

Фракції ПМ штаму	Нативні клітини		Ліофілізовані клітини	
	Активність каталази, ммоль H_2O_2/сек мг білка	Загальна АОА, % інгібіції	Активність каталази, ммоль H_2O_2/сек мг білка	Загальна АОА, % інгібіції
E. coli № 25	20,52±1,45	16,00±1,60	4,54±0,25*	10,67±0,80*
E. coli № 24	6,64±0,30	34,40±1,60	3,76±0,18*	75,40±3,20*
E. coli № 20	2,36±0,05	50,80±4,60	1,60±0,08*	83,60±5,50*

Встановлено, що посилення інтенсивності процесів ПОЛ і ОМБ у мембранах *E. coli* штамів № 24 і 20 супроводжувалось зростанням рівня показника загальної АОА на 119,2 % і 64,6 % ($p \leq 0,05$) відповідно. Процеси активації неферментативної ланки АОС, очевидно, носять компенсаторний характер для мембран стресованих клітин. Але, у мембранах бактерій штаму № 25 визначено зниження рівня цього показника на 33,3 % ($p \leq 0,05$), що вказує на менш потужний біологічний потенціал клітин цього штаму.

Аналіз характеру впливу наночастинок металів у розмірному діапазоні на інтенсивність процесів ПОЛ у мембранах клітин досліджених штамів наведено на рисунках 4–6.

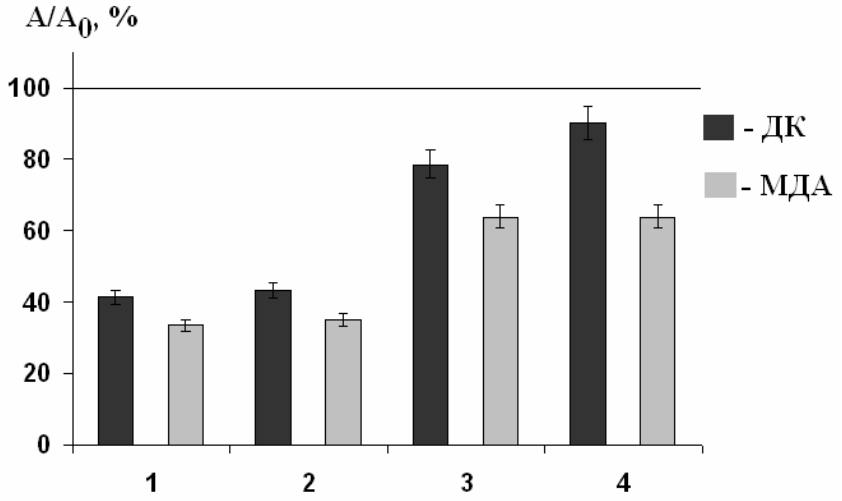

Рис. 4. Зміни показників інтенсивності процесів ПОЛ (за значенням вмісту ДК і МДА) мембранної фракції ліофілізованих/регідратованих клітин штаму *E. coli* № 25 під впливом наночастинок Au розміром 20 нм (1), 30 нм (2), 45 нм (3) у концентрації 1,16 мкг/мл за металом та наночастинок Ag розміром 30 нм (4) у концентрації 2,59 мкг/мл за металом.

Примітка: За 100 % прийняте значення показників ДК та МДА мембранної фракції ліофілізованих/регідратованих клітин штаму *E. coli* № 25 без впливу наночастинок металів

Визначено, що концентрація наночастинок суттєво не впливала на ступінь інтенсивності процесів ПОЛ у ПМ нативних клітин *E. coli.* Але було встановлено вірогідне зниження інтенсивності процесів ПОЛ за рівнем його продуктів у мембранах клітин штаму № 25 за умов впливу наночастинок обох металів у всьому розмірному діапазоні. Виражене гальмування інтенсивності ліпопероксидації у ПМ клітин штамів № 25 і 20 реєстрували при застосуванні наночастинок Au розміром ~20 і ~45 нм та Ag розміром ~30 нм. У ПМ клітин штаму № 24 внаслідок їх інкубації з наноматеріалами вірогідних змін інтенсивності ПОЛ не визначали.

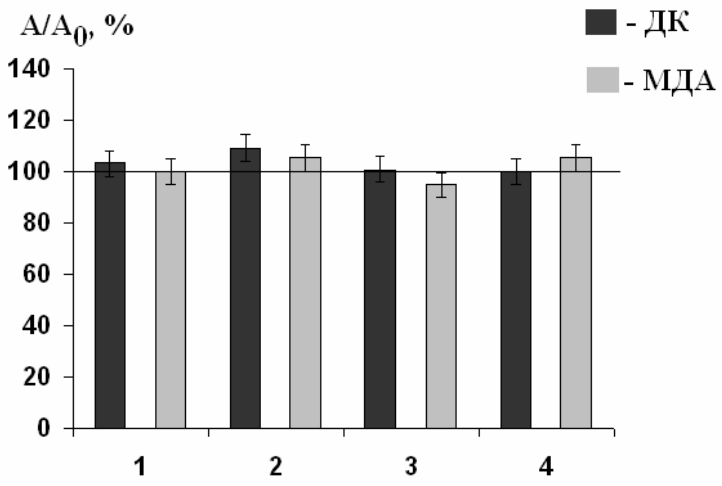

Рис. 5. Зміни показників інтенсивності процесів ПОЛ (за значенням вмісту ДК і МДА) мембранної фракції ліофілізованих/регідратованих клітин штаму *E. coli* № 24 під впливом наночастинок Au розміром 20 нм (1), 30 нм (2), 45 нм (3) у концентрації 1,16 мкг/мл за металом та наночастинок Ag розміром 30 нм (4) у концентрації 2,59 мкг/мл за металом.

Примітка: За 100 % прийняте значення показників ПОЛ (ДК та МДА) мембранної фракції ліофілізованих/регідратованих клітин штаму *E. coli* № 24 без впливу наночастинок металів

Інкубація наночастинок з мембранами регідратованих клітин штамів № 24 і 20 приводила до активації ПОЛ відносно його інтенсивності у нативних клітин з додаванням наноматеріалів, але рівень його продуктів вірогідно не перевищував у середньому такий у контролі ліофілізованих клітин.

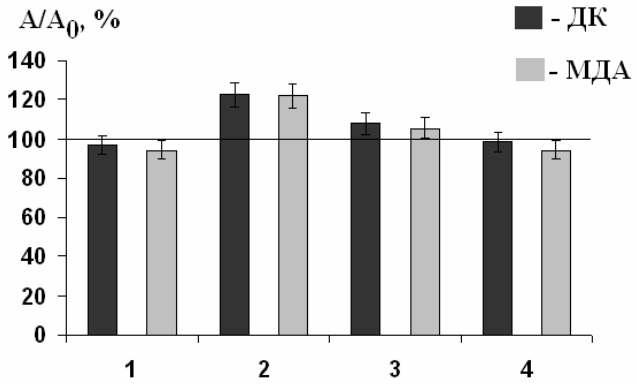

Рис. 6. Зміни показників інтенсивності процесів ПОЛ (за значенням вмісту ДК і МДА) мембранної фракції ліофілізованих/регідратованих клітин штаму *E. coli* № 20 під впливом наночастинок Au розміром 20 нм (1), 30 нм (2), 45 нм (3) у концентрації 1,16 мкг/мл за металом та наночастинок Ag розміром 30 нм (4) у концентрації 2,59 мкг/мл за металом.

Примітка: За 100 % прийняте значення показників ДК та МДА мембранної фракції ліофілізованих/регідратованих клітин штаму *E. coli* № 20 без впливу наночастинок металів

За умов взаємодії наночастинок металів обох розмірів з мембранами нативних і регідратованих клітин усіх штамів у цілому відбувалось пригнічення інтенсивності ОМБ, що виявлялось у вірогідному зниженні рівня його похідних у мембранах *E. coli* відносно контролів (рис. 7–9).

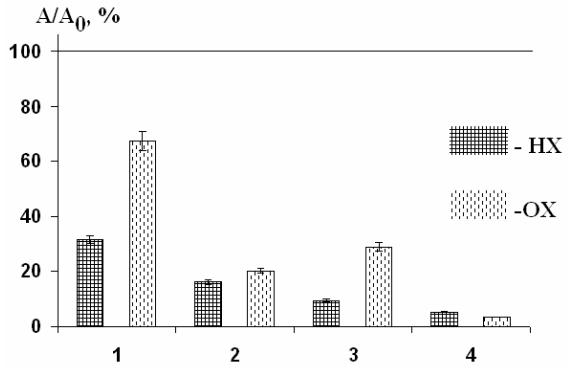

Рис. 7. Зміни показників інтенсивності ОМБ (за значенням вмісту кетопохідних НХ і ОХ) мембранної фракції ліофілізованих/регідратованих клітин штаму *E. coli* № 25 під впливом наночастинок Au розміром 20 нм (1), 30 нм (2), 45 нм (3) у концентрації 1,16 мкг/мл за металом та наночастинок Ag розміром 30 нм (4) у концентрації 2,59 мкг/мл за металом.

Примітка: За 100 % прийняте значення показників кетопохідних НХ і ОХ мембранної фракції ліофілізованих/регідратованих клітин штаму *E. coli* № 25 без впливу наночастинок металів

Більш виражене зниження вмісту похідних НХ і ОХ (до 60–80 %) ($p \leq 0,05$) реєстрували у мембранах регідратованих клітин усіх дослідних штамів внаслідок впливу наночастинок Au розміром ~30 і ~45 нм та Ag розміром ~30 нм відносно їх значень у контролі для ліофілізованих.

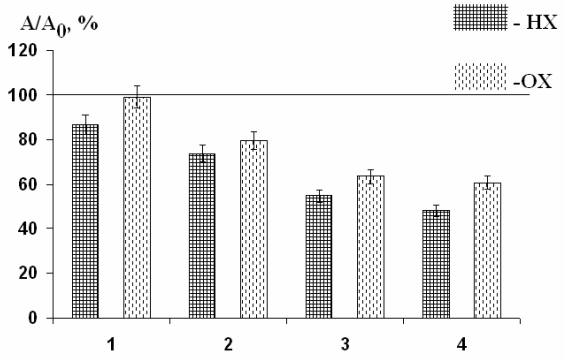

Рис. 8. Зміни показників інтенсивності ОМБ (за значенням вмісту кетопохідних НХ і ОХ) мембранної фракції ліофілізованих/регідратованих клітин штаму *E. coli* № 24 під впливом наночастинок Au розміром 20 нм (1), 30 нм (2), 45 нм (3) у концентрації 1,16 мкг/мл за металом та наночастинок Ag розміром 30 нм (4) у концентрації 2,59 мкг/мл за металом.

Примітка: За 100 % прийняте значення показників кетопохідних НХ і ОХ мембранної фракції ліофілізованих/регідратованих клітин штаму *E. coli* № 24 без впливу наночастинок металів

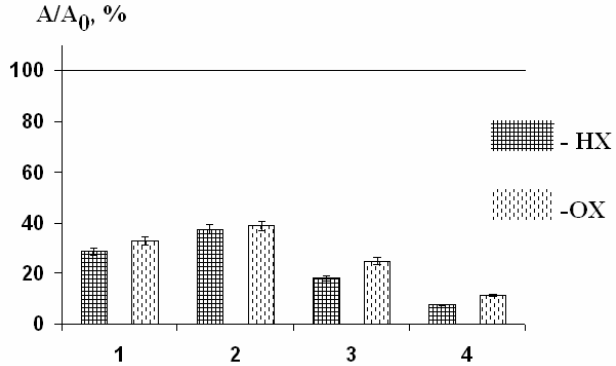

Рис. 9. Зміни показників інтенсивності ОМБ (за значенням вмісту кетопохідних НХ і ОХ) мембранної фракції ліофілізованих/регідратованих клітин штаму *E. coli* № 20 під впливом наночастинок Au розміром 20 нм (1), 30 нм (2), 45 нм (3) у концентрації 1,16 мкг/мл за металом та наночастинок Ag розміром 30 нм (4) *у концентрації 2,59 мкг/мл за металом.*

Примітка: За 100 % прийняте значення показників кетопохідних НХ і ОХ мембранної фракції ліофілізованих/регідратованих клітин штаму *E. coli* № 20 без впливу наночастинок металів

На рисунках 9–11 наведені результати впливу наночастинок металів на стан показників АОС мембран *E. coli*. Внаслідок взаємодії мембран нативних клітин штамів №

20 і 24 з нанопрепаратами реєстрували активацію каталази відносно її значень у контролі. У ПМ нативних клітин штамів № 25, навпаки, її активність була вірогідно знижена, але набувала підвищення для ліофілізованих клітин штамів № 25 і 20 при взаємодії з наночастинками Au усіх розмірів ($p \leq 0,05$) на відміну від зниження цього показника у ПМ інших штамів. Інкубація наночастинок Au досліджених розмірів з мембранами регідратованих клітин штаму № 25 приводила до зростання рівня загальної АОА та активності каталази відносно значень цих показників у контролі для ліофілізованих ($p \leq 0,05$).

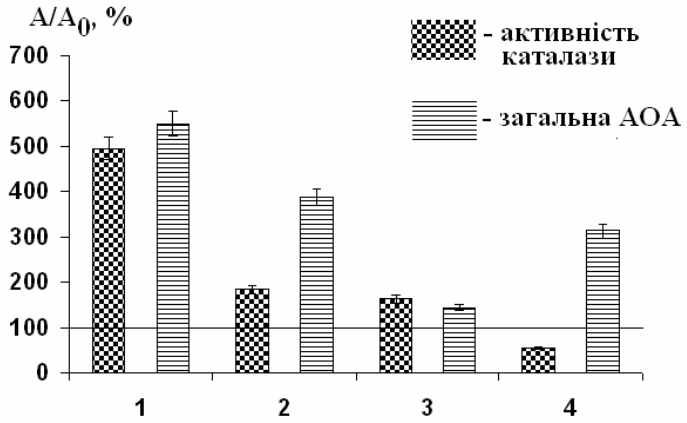

Рис. 9. Зміни показників АОЗ (за значенням активності каталази та загальної АОА) мембранної фракції ліофілізованих/регідратованих клітин штаму *E. coli* № 25 під впливом наночастинок Au розміром 20 нм (1), 30 нм (2), 45 нм (3) у концентрації 1,16 мкг/мл за металом та наночастинок Ag розміром 30 нм (4) у концентрації 2,59 мкг/мл за металом.

Примітка: За 100 % прийняте значення показників АОЗ (активність каталази та загальна АОА) мембранної фракції ліофілізованих/регідратованих клітин штаму *E. coli* № 25 без впливу наночастинок металів

Під впливом наночастинок Ag у мембранах регідратованих клітин штаму № 25 реєстрували підвищення рівня загальної АОА, а штаму № 20 — посилення активності каталази майже у 2,0–2,5 раза ($p \leq 0,05$). Одержані дані щодо надмірної активації каталази та зростання рівня показника АОА у мембранах нативних і ліофілізованих клітин штамів № 25 і 20 за умов впливу наночастинок, не дозволяють зробити однозначний висновок щодо характеру впливу нанопрепаратів на мембрану клітин *E. coli*.

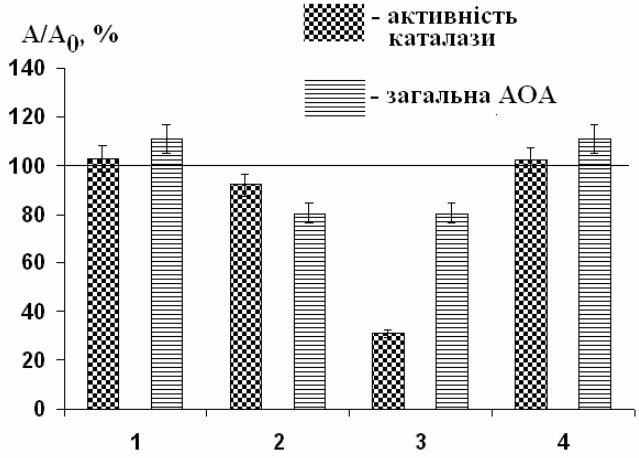

Рис. 10. Зміни показників АОЗ (за значенням активності каталази та загальної АОА) мембранної фракції ліофілізованих/регідратованих клітин штаму *E. coli* № 24 під впливом наночастинок Au розміром 20 нм (1), 30 нм (2), 45 нм (3) у концентрації 1,16 мкг/мл за металом та наночастинок Ag розміром 30 нм (4) у концентрації 2,59 мкг/мл за металом.

Примітка: За 100 % прийняте значення показників АОЗ (активність каталази та загальна АОА) мембранної фракції ліофілізованих/регідратованих клітин штаму *E. coli* № 24 без впливу наночастинок металів

Підсумуючи вищевикладене, слід зазначити, що у мембранах ліофілізованих клітин за умов контактної взаємодії з наночастинками металів дослідних розмірів регуляторні

механізми окиснювальних процесів характеризуються у цілому втручанням реакцій загальної АОА, змінами активності каталази та гальмуванням утворення похідних ОМБ, що може обумовлювати потенціал клітин *E. coli* досліджених штамів щодо їх резистентності при дії стресорних чинників. Очевидно, уповільнення окиснювальної модифікації білків відбувається шляхом стабілізації активних груп та нормалізації стану мембранних рецепторів та активності мембранозв'язаних ферментів. Тобто, як опосередковано, так й напряму через процеси нормалізації вільнорадикального окиснювання ліпідів активно блокується цитолітичний синдром [2–6].

З іншого боку, встановлено, що потенціалу власної АОС захисту мембран ліофілізованих клітин *E. coli* штаму № 20 і 24 виявилось недостатньо для для включення протективних механізмів щодо зберігання нативної структури мембрани та запобігання впливу АМК, навіть, після інкубації з наночастинками Au розміру ~30 нм. Цей факт можна пояснити тим, що міцела наночастинки, яка має сорбційну оболонку, дозволяє колоїдним частинкам проявляти високу сорбційну активність до різного роду токсичних метаболітів.

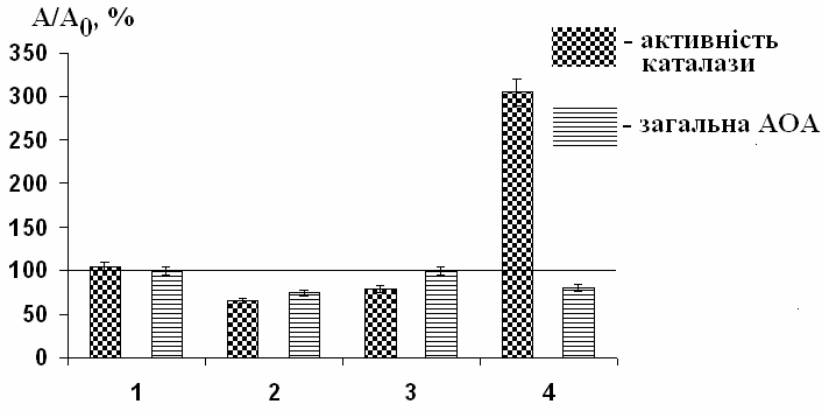

Рис. 11. Зміни показників АОЗ (за значенням активності каталази та загальної АОА) мембранної фракції ліофілізованих/регідратованих клітин штаму *E. coli* № 20 під впливом наночастинок Au розміром 20 нм (1), 30 нм (2), 45 нм (3) у концентрації 1,16мкг/мл за металом та наночастинок Ag розміром 30 нм (4) у концентрації 2,59 мкг/мл за металом.

Примітка: За 100 % прийняте значення показників АОЗ (активність каталази та загальна АОА) мембранної фракції ліофілізованих/регідратованих клітин штаму *E. coli* № 20 без впливу наночастинок металів

Проте, беззаперечним є факт індивідуального специфічного характеру впливу нанопрепаратів на функціональний стан бактеріальних клітин у межах одного виду. Наявність такого стимулюючого та/або відновлюючого ефектів щодо інтенсивності біохімічних реакцій найбільш імовірно обумовлена унікальними фізико-хімічними властивостями наночастинок Au і Ag, перш за все, їх здатністю проявляти каталітичні властивості відносно біохімічних процесів через добре розвинену активну поверхню та високу реакційність [4–6]. При цьому каталітична дія наночастинок металів може бути реалізована через безпосередній вплив на саме фермент (взаємодія з функціональними зарядженими групами білкової молекули, що приводить до певних конфірмаційних змін).

Висновки

За підсумком одержаних результатів встановлено, що досліджені нанопрепарати Au розміром ~30 нм і ~45 нм та Ag розміром ~30 нм справляють достовірно стимулюючу та/або відновлюючу дію на мембрани клітин *Escherichia* за інтенсивністю біохімічних процесів, тобто виявляють мембранотропний вплив; використання їх за таким призначенням надає можливість створити новий засіб управління біологічними властивостями ентеробактерій.

Перспективи подальших досліджень. Основним результатом застосування наночастинок може бути стимуляція культуральних, репродуктивних та біологічних властивостей виробничих штамів мікроорганізмів за умов будь-якого стресу і довготривалого зберігання, та у технологіях отримання ВІП різного профілю.

M. Ye. Roman'ko

MEMBRANE-TROPIC EFFECT OF AURUM AND ARGENTUM NANOPARTICLES ON THE INTENSITY OF OXIDATIVE PROCESSES IN ESCHERICHIA CELLS UNDER THE CONDITIONS OF THEIR LYOPHILIZATION/ REHYDRATION

S u m m a r y

There was determined that lyophilization/ rehydration processes inhibit intensity of lipid peroxidation processes ((№ 25, 20) and increase protein oxidation (№ 25, 24, 20) in the membranes of E. coli rehydrative cells in comparison with the state of these processes in the native cell membranes ($p \leq 0,05$). At that in the cell membranes of experimental strains there was registered expressed inhibition of catalase activity, reduce of activity indices, that was at the average from 32,2 % to 77,9 %, and 91,9% increase of the level of total antioxidant activity.

Under the conditions of contact interaction with aurum nanoparticles (Au) with the size ~30 nm and ~45nm and argentum (Ag) with the size ~30 nm regulatory mechanisms of oxidative processes in E. coli cell membranes are characterized in total by interference of total antioxidant activity reactions, changes of catalase activity and inhibition of protein oxidation ***ketoderivatives*** creation, that may cause potential of investigated strains cells to their resistance at the influence of stress factors.

There was determined, that potential of own antioxidative system of E. coli lyophilized cell membranes, strains № 20 and 24 was not enough for the maintenance of membrane lipid native structure and for the prevention of AOM influence even after incubation with Au nanoparticles with the size ~30 nm. Multidirectional changes of determinate characteristics in the E.coli membranes of different strains are the undoubted fact of individual specific character of nanopreparations' influence of the cell functional state in the bounds of one species. As a result of obtained data there was determined that an interaction of nanopreparations with different strains of E. coli cells there had not been registered dependence of the character of their effect from the selected range of concentrations.

М. Е. Романько

МЕМБРАНОТРОПНОЕ ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ АУРУМА И АРГЕНТУМА НА ИНТЕНСИВНОСТЬ ОКИСЛИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ В КЛЕТКАХ ESCHERICHIA В УСЛОВИЯХ ИХ ЛИОФИЛИЗАЦИИ/РЕГИДРАТАЦИИ

А н н о т а ц и я

Установлено, что процессы лиофилизации/регидратации влияют угнетающим образом на интенсивность процессов перекисного окисления липидов (№ 25, 20) и усиливающим на окисление белков (№ 25, 24, 20) в мембранах регидратированных клеток E. coli в сравнении с состоянием этих процессов в мембранах нативных клеток ($p \leq 0,05$). При этом в мембранах клеток опытных штаммов регистрировали выраженную ингибицию активности каталазы, снижение значений активности которой составляло в среднем от 32,2 % до 77,9 %, и увеличение уровня показателя общей АОА в среднем на 91,9 %.

В условиях контактного взаимодействия с наночастицами аурума (Au) размером ~30 нм и ~45 нм и аргентума (Ag) размером ~30 нм регуляторные механизмы

окислительных процессов в мембранах клеток E. coli в целом характеризуются вмешательством реакций общей АОА, изменениями активности каталазы и угнетением образования кетопроизводных окисления белков, что может обуславливать потенциал клеток происследованных штаммов к их резистентности при воздействии стрессорных факторов. Установлено, что потенциала собственной антиокислительной системы мембран лиофилизированных клеток E.coli штаммов № 20 і 24 выявилось недостаточно для сохранения нативной структуры липидов мембрани и предупреждения влияния АМК даже после инкубации с наночастицами Au размером ~30 нм.

Разнонаправленные изменения определяемых показателей в мембранах E.coli разных штаммов являются безусловным фактом индивидуального специфического характера влияния нанопрепаратов на функциональное состояние клеток в границах одного вида.

В результате полученных даннях установлено, что при взаимодействии нанопрепаратов с клетками E.coli разных штаммов не регистрировали зависимости характера их влияния от избранного диапазона концентраций.

1.*West J. L.* Application of nanotechnology to biotechnology [Текст] / J. L. West, N. J. Halas // Current Opinion in Biotechnology. — 2000. — Vol. 11. — P. 215–217.

2. *Bawa R.* Nanoparticle-based therapeutics in humans: a survey [Текст] / R. Bawa // Nanotechnology Law & Business. — 2008. — Vol. 5, No. 2. — P. 135–155.

3. *Sahoo S. K.* The present and future of nanotechnology in human health care [Текст] / S. K. Sahoo, S. Parveen, J. J. Panda // Nanomedicine. — 2007. — No. 3. — P. 20–31.

4. *Chen Po. C.* Gold nanoparticles: from nanomedicine to nanosensing [Текст] / Po. C. Chen, S. C. Mwakwari, A. K. Oyelere // Nanotechnology, Science and Application. — 2008. — No. 1. — P. 45–66.

5. *Chah S.* Gold nanoparticles as a colorimetric sensor for protein conformational changes [Текст] / S. Chah, M. R. Hammond, R. N. Zare // Chemistry & Biology. — 2005. — Vol. 12. — P. 323–328.

6. *Aslan K.* Nanogold-plasmon-resonance-based glucose sensing [Текст] / K. Aslan, J. R. Lakowicz, C. D. Geddes // Analytical Biochemistry. — 2004. — Vol. 330. — P. 145–155.

7. *Aaron J.* Polarization microscopy with stellated gold nanoparticles for robust, in-situ monitoring of biomolecules [Текст] / J. Aaron, E. de la Rosa, K. Travis [et al.] // Optic Express. — 2008. — Vol. 16, No. 3. — P. 2153–2167.

8. *Letfullin R. R.* Laser-induced explosion of gold nanoparticles: potential role for nanophotothermolysis of cancer [Текст] / R. R. Letfullin, C. Joenathan, T. F. George, V. Zharov // Nanomedicine. — 2006. — Vol. 1, No. 4. — P. 473–480.

9. ISO 13408–3:2006 Асептична обробка виробів призначених для охорони здоров'я. — Ч. 3 : Ліофілізація. — 18 с.

10. *Пушкарь Н. С.* Теория и практика криогенного и сублимационного консервирования [Текст] / Н. С. Пушкарь, А. М. Белоус, Ц. Д. Цветков. — Киев : Наукова думка, 1984. — 264 с.

11. *Дубинина Е. Е.* Окислительная модификация протеинов, ее роль при патологических состояниях [Обзор] / Е. Е. Дубинина, А. В. Пустыгина // Укр. біохім. журн. — 2008. — Т. 80, № 6. — С. 5–18.

12. *Дубинина Е. Е.* Роль активных форм кислорода в качестве сигнальных молекул в метаболизме ткани при состояниях окислительного стресса [Текст] / Е. Е. Дубинина // Вопр. мед. химии. — 2001. — Т. 47, № 6. — С. 561–581.

13. *Зенков Н. А.* Окислительный стресс: биохимический и патофизиологический аспект [Текст] / Н. К. Зенков, В. З. Ланкин, Е. Б. Меньщикова. — М. : Маик, 2001. — 343 с.

14. *Турпаев К. Т.* Активные формы кислорода и экспрессия генов [Текст] / К. Т. Турпаев // Биохимия. — 2002. — Т. 67, Вып. 3. — С. 339–352.

15. *Меньщикова Е. Б.* Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты [Текст] / Е. Б. Меньщикова, В. З. Ланкин, И. А. Бондарь [и др.]. — М. : Фирма «Слово», 2006. — 556 с.

16. *Рєзніченко Л. С.* Вплив металів-мікроелементів на біохімічні показники бактерій-пробіонтів [Текст] / Л. С. Рєзніченко, Т. Г. Грузіна, В. В. Вембер, З. Р. Ульберг // Укр. біохім. журн. — 2008. — 80, № 1. — С. 96–101.

17. *Данилович Г. В.* Вплив іонного і колоїдного золота на АТР-гідролазні ферментні системи в мембрані мікроорганізмів *Bacillus sp. B4253* та *Bacillus sp. B4851* [Текст] / Г. В. Данилович, Т. Г. Грузіна, З. Р. Ульберг, С. В. Костерін // Укр. біохім. журн. — 2007. — 79, № 4. — С. 46–51.

18. Методические разработки к практикуму по коллоидной химии [Текст] / под ред. А. В. Перцова. — М. : Изд-во МГУ им. М. В. Ломоносова, 1976. — С. 126–130.

19. *Rawle A.* Basic principles of particle size analysis. [Електронний ресурс] / A. Rawle // Malvern Instruments Limited. www.malvern.co.uk.

20. *Miller G. L.* Protein determination for large numbers of samples [Текст] / G. L. Miller // Anal. Chem. — 1959. — V. 31, N 5. — P. 964–966.

21. *Гаврилова В. Б.* Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови [Текст] / В. Б. Гаврилова, М. И. Мишкорудная // Лаб. дело. — 1985. — № 3. — С. 33–35.

22. *Арчаков А. И.* Модификация белков активным кислородом и их распад [Текст] / А. И. Арчаков, И. М. Михосоев // Биохимия. — 1998. — Т. 54, № 2. — С. 179–186.

23. *Королюк М. А.* Определение активности каталаз [Текст] / М. А. Королюк // Лаб. дело. — 1988. — № 1. — С. 16–18.

24. *Клебанов Г. И.* Оценка антиокислительной активности плазмы крови с применением желточных липопротеидов [Текст] / Г. И. Клебанов, И. В. Бабенкова, Ю. О. Теселкин [и др.] // Лаб. дело. — 1988. — № 5. — С. 59–62.

25. *Лакин Г. Ф.* Биометрия : учебное пособие для биологических специальностей ВУЗов. [Текст] / Г. Ф. Лакин. — М. : Высшая школа, 1990. — 352 с.

26. *Гуськов Е. П.* Избыточность фенотипа, оксигенный мутагенез и концепция буферного катаболизма [Текст] / Е. П. Гуськов, А. И. Лукаш. — Ростов н/Д, 1986. — 20 с. — Деп. в ВИНИТИ 11.05.86, № 3363-В86.

27. *Кения М. В.* Динамика свободнорадикальных процессов и продуктов азотистого катаболизма в тканях системы крови при гипероксии : автореф. дисс. на соискание канд. биол. наук: спец. 03.00.04 «Биохимия» / М. В. Кения. — Ростов н/Д, 1991. — 19 с.

28. *Старикович Л. С.* Исследование прогностической роли активности энзимов антиоксидантной защиты в окислительной модификации белков после действия низкоинтенсивного ионизирующего излучения [Текст] / Л. С. Старикович, Л. А. Дацюк, У. В. Старанко [и др.] // Лабораторная диагностика. — 2008. — 1 (43). — С. 57–60.

29. *Кения М. В.* Роль низкомолекулярных антиоксидантнов при окислительном стрессе [Текст] / М. В. Кения, А. И. Лукаш, Е. П. Гуськов // Успехи совр. биологии. — 1993. — Вып. 113, № 4. — С. 456–470.

Рецензент: провідний науковий співробітник НВЦ з вивчення пріонних інфекцій, доктор сільськогосподарських наук Остапів Д. Д.

Автор висловлює подяку к.біол.н., с.н.с. Грузіної Т. Г. та наук. спів. Рєзніченко Л. С. (Інститут біоколоїдної хімії ім. Ф. Д. Овчаренка НАН України) за допомогу у синтезі наночастинок і проведенні лазерно-кореляційної спектрометрії та конфокальної мікроскопії.