

УДК: 576:314:577.1:57.08

Рівень інтенсивності процесів переокиснення ліпідів і окиснювальної модифікації білків у мембранних фракціях клітин *Escherichia coli* як біомаркер тестування біосумісності наночастинок металів
М.Є.Романько

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини»
(Харків, Україна)
marina_biochem@ukr.net

Метою нашої роботи було визначення інтенсивності переокисного окиснення ліпідів (ПОЛ) за рівнем утворення його продуктів – дієнових кон'югатів і малонового діальдегіду та окиснювальної модифікації білків (ОМБ) – за рівнем утворення карбоксильних похідних нейтрального і основного характеру у ізольованих мембранних фракціях клітин *Escherichia coli* виробничих штамів за умов преінкубації з наночастинами Ауруму та Аргентуму (NPAu та NPAg) в розмірному діапазоні. Встановлено, що дослідні зразки NPAu і NPAg середнього розміру ~30 нм за дії на мембранні фракції клітин *E. coli* усіх дослідних штамів (за винятком штаму 57) сприяють уповільненню та/або утриманню на фізіологічному рівні інтенсивність процесів окиснення ліпідів та окисної деструкції білків, що супроводжується втручанням реакцій антиокиснювальної системи (АОС) за підвищенням рівня показника загальної антиокиснювальної активності (АОА) та змінами активності каталази ($p \leq 0,05$) та дозволяє стверджувати про мембранотропні властивості таких NPMe; використання їх надає можливість створити новий засіб управління структурно-функціональним станом бактеріальних клітин. У випадку контактної взаємодії NPAu середнього розміру ~20 і ~45 нм та NPAg середнього розміру ~30 нм з сумарними мембранними фракціями клітин штаму 57 реєстрували посилення інтенсивності процесів ПОЛ і ОМБ, а за взаємодії NPAu розміру ~20 нм з клітинами штаму 20 – лише процесів ОМБ відповідно, що вказує на прооксидантну і мембранотоксичну дію таких NPMe саме у цих розмірах. Тобто, у випадку активації ліпопероксидації за дії NPAu окисний стрес може мати сигнальний характер, а у випадку інтенсифікації процесів ОМБ на фоні фізіологічного рівня активності ПОЛ за дії NPAg – руйнівний характер відповідно. Слід зазначити також, що важливим аспектом з'ясування впливу наночастинок металів на систему АОС є встановлення залежності її реакції від вихідного редокс-статусу саме клітини. Таким чином, потенційна небезпечність дослідних NPMe носить залежний від їх дискретного розміру характер та є індивідуальною для різних штамів у межах одного таксономічного виду мікроорганізмів, з іншого боку – конкретні механізми біосумісності або цитотоксичної дії NPMe виокремити складно, бо вони можуть сильно відрізнятися навіть у межах одного класу наноматеріалів, тому це питання поки ще має дискусійний характер.

Ключові слова: наночастинки металів, бактеріальна клітина, сумарні мембранні фракції, переокисне окиснення ліпідів, окиснювальна модифікація білків, антиокиснювальна система.

Level of intensity of lipid peroxidation and oxidizing modification of proteins process in membranic fractions of *Escherichia coli* cells as a biomarker of metals nanoparticles biocompatibility testing
M.Ye.Roman'ko

The purpose of our work was to determine the intensity of lipid peroxidation (LPO) by the level of formation of its products – diene conjugates and malonic dialdehyde and oxidation modification of proteins (OMB) – by the level of formation of neutral and basic carboxylic derivatives in isolated total membrane fraction (TMF) of *Escherichia coli* cells of production strains under preincubation conditions with nanoparticles of Aurum and Argentum (NPAu and NPAg) in the size range. It has been determined that experimental samples of NPAu and NPAg of an average size of ~30 nm can be considered as the most biocompatible for the restoration and/or normalization of the intensity of the LPO and OMB processes in the membrane fractions of *E. coli* cells of production strains indicating their membranotropic properties; the use of them provides the opportunity to create a new means of managing the structural and functional state of bacterial cells. In the case of contact interaction of NPAu of an average size of ~20 and ~45 nm and NPAg of an average size of ~30 nm with TMF of cells of strain 57 an increase was recorded in the intensity of the LPO and OMB processes, and at interaction of NPAu of a size of ~20 nm with cells of the strain 20 – OMB processes, respectively, indicating the prooxidant and membranotoxic effects of such NPMs of these sizes. That is, in the case of the lipoperoxidation activation at the action of NPAu oxidative stress can be signaling and in the case of

intensification of OMB processes at the physiological level of LPO activity and at NPAg action – destructive. It should also be noted that an important aspect of clarifying the influence of nanoparticles of metals on antioxidant system (AOS) is to determine the dependence of its reaction on the original redox status of the cell itself. That is, the potential danger of experimental NPMs is dependent on their discrete sizes and is individual for different strains within a single taxonomic type of microorganism; on the other hand, the specific mechanisms of biocompatibility or cytotoxic action of NPMs are difficult to distinguish because they can vary greatly even within the same class of nanomaterials, so this question is still debatable.

Key words: *nanoparticles of metals, bacterial cell, total membrane fractions, lipid peroxidation, oxidation modification of proteins, antioxidant system.*

Уровень интенсивности процессов переокисления липидов и окислительной модификации белков в мембранных фракциях клеток *Escherichia coli* как биомаркер тестирования биосовместимости наночастиц металлов М.Е.Романько

Целью нашей работы было определение интенсивности перекисного окисления липидов (ПОЛ) по уровню образования его продуктов – диеновых конъюгатов и малонового диальдегида и окислительной модификации белков (ОМБ) – по урону образования карбоксильных производных нейтрального и основного характера в изолированных мембранных фракциях клеток *Escherichia coli* производственных штаммов в условиях преинкубации с наночастицами Аурума и Аргентума (NPAu и NPAg) в размерном диапазоне. Установлено, что опытные образцы NPAu и NPAg среднего размера ~30 нм при воздействии на мембранные фракции клеток *E. coli* всех штаммов (за исключением штамма 57) способствуют снижению и/или удержанию на физиологическом уровне интенсивности процессов ПОЛ и ОМБ, что сопровождается участием реакций антиокислительной системы (АОС) – увеличением уровня показателя общей антиокислительной активности (АОА) и изменением активности каталазы ($p \leq 0,05$), и позволяет утверждать о мембранотропных свойствах таких NPMе; использование их предоставит возможность создания нового способа управления структурно-функциональным состоянием бактериальных клеток. В случае контактного взаимодействия NPAu среднего размера ~20 и ~45 нм и NPAg размера ~30 нм с суммарными мембранными фракциями клеток штамма 57 регистрировали усиление интенсивности процессов ПОЛ и ОМБ, а при взаимодействии NPAu размером ~20 нм с клетками штамма 20 – только процессов ОМБ соответственно, что указывает на проокислительное и мембранотоксическое действие таких NPMе именно этих размеров. Поэтому в случае активации липопероксидации при воздействии NPAu окислительный стресс может носить сигнальный характер, а в случае интенсификации процессов ОМБ на фоне физиологического уровня активности ПОЛ при воздействии NPAg – разрушительный характер соответственно. Следует отметить также, что важным аспектом изучения влияния наночастиц металлов на систему АОС может быть определение зависимости ее реакций от исходного редокс-статуса клетки. Таким образом, потенциальная небезопасность опытных NPMе носит зависимый от их дискретного размера характер и индивидуальна для различных штаммов в пределах одного таксономического вида микроорганизмов, с другой стороны – конкретные механизмы биосовместимости или цитотоксического действия NPMе установить сложно, так как они могут значительно отличаться в пределах даже одного класса наноматериалов, поэтому эти вопросы пока носят дискуссионный характер.

Ключевые слова: *наночастицы металлов, бактериальная клетка, суммарные мембранные фракции, перекисное окисление липидов, окислительная модификация белков, антиокислительная система.*

Вступ

Стрімкий розвиток сучасних технологій синтезу наноматеріалів різноманітної природи дозволив значно розширити межі їх застосування у різних галузях промисловості та медицини (West, Halas, 2000; Sahoo et al., 2007; Chen et al., 2008; Wawa, 2008; Абрамов и др., 2011; Стойка, 2017), створилися умови для більш тісного контакту продуктів нанобіотехнологій з живим організмом та зовнішнім середовищем. Проте доволі активне використання наноматеріалів у різних галузях господарювання, на жаль, не супроводжується системними ґрунтовними дослідженнями їх побічної (небажаної, ушкоджуючої, токсичної) дії. Питання біологічної безпеки наноматеріалів неоднозначне, багатогранне та вимагає комплексного науково-обґрунтованого підходу (Oberdorster et al., 2005; Чекман та ін., 2009, 2012). Політика Європейського Союзу (ISO/TC 229

«Нанотехнологія») в цієї галузі може бути сконцентрована у формулу: «Комплексний, безпечний та відповідальний підхід», тобто впровадженню продуктів нанобіотехнологій та масованим рекламним компаніям стосовно їх ефективності повинні передувати наукові дослідження з метою оцінки можливих медико-санітарних чи екологічних ризиків при їх застосуванні, а науковий супровід у цьому напрямку безперечно необхідний.

Відомі наукові роботи присвячені уявленню цитотоксичної дії наночастинок взагалі на рівні культур клітин або стосовно інших видів – карбонових нанотрубок, фулеренів, модифікованих наноалмазів (Shvedova et al., 2004; Oberdorster et al., 2005; Weyermann et al., 2005; Chen et al., 2006; Garçon et al., 2006; Powers, Brown, 2006; Lynch et al., 2007), її залежності від концентрації, розміру, шляхів і тривалості введення (Ершов, 2001; Чекман та ін., 2009, 2012).

Наночастинки металів (NPMe) посідають основне місце серед наноматеріалів та мають високий комерційний потенціал з перспективами широкомасштабного застосування. У експериментах *in vivo* та *in vitro* доведено, що цитотоксичність NPMe зумовлена гено- і мутагенними ефектами (Shvedova et al., 2004; Jia et al., 2005; Brunner et al., 2006), але не зовсім переконливо розмежований та інтерпретований характер токсичних ефектів і біосумісність NPMe, не вистачає ґрунтовного вивчення біохімічних механізмів з'ясування їх природи.

Одним із визначальних біохімічних механізмів дії факторів ризику агресивних агентів докільля є порушення рівноваги між інтенсивністю процесів окиснення структурних компонентів клітинних мембран – ліпідів і білків та їх антиоксидантною регуляцією (Beker et al., 1985; Феофилова, 1993; Sherman et al., 1995; Харчук, 2005), з іншого боку, ціла низка авторів вважає (Li et al., 2003; Yamakoshi et al., 2003; Garçon et al., 2006), що механізми цитотоксичних ефектів наноматеріалів різного походження пов'язані з формуванням окиснювального стресу та накопиченням токсичних продуктів ліпопероксидації.

Відомо, що цитоплазматична мембрана будь-якої клітини ушкоджується у першу чергу, так як вона слугує бар'єром між поза- та внутрішньоклітинним оточенням, що забезпечує селективний транспорт речовин (Іваница, Рахімова, 2002; Беленічев та ін., 2002; Харчук, 2005; Oberdorster et al., 2005). Активні метаболіти кисню (АМК), утворені у 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 стартовим чинником запуску механізмів окиснення білків і ліпідів, впливати на експресію генів та репараційні, метаболічні і біосинтетичні процеси (Дубинина, 2001; Зенков и др., 2001; Турпаев, 2002).

З'ясування механізмів взаємодії NPMe з клітинними мембранами дозволить розширити фундаментальні знання стосовно їх потенційної цитотоксичної дії або біосумісності для клітин різного рівня організації, а також прикладні аспекти, пов'язані з їх використанням у сучасних біотехнологіях. Прокаріотичні клітини, завдяки унікальним структурним властивостям та обміну речовин здатні активно контактувати з металами та можуть бути модельною системою для вивчення взаємовідносин між клітиною і NPMe.

У зв'язку з вищесказаним, метою нашої роботи було визначення інтенсивності перекисного окиснення ліпідів та окиснювальної модифікації білків у ізолюваних мембранних фракціях клітин *Escherichia coli* виробничих штамів за умов преінкубації з наночастинами Ауруму та Арґентуму в розмірному діапазоні.

Об'єкти та методи дослідження

В роботі використовували періодичні культури клітин *Escherichia coli* виробничих штамів 57, 25, 24 і 20, які підтримуються та зберігаються у ліофілізованому вигляді в Депозитарії Національного центру штамів мікроорганізмів Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів (Київ, Україна).

Біомасу культур клітин *E. coli* дослідних штамів накопичували на стандартних поживних середовищах (МПА, МПБ) за температури $37\pm 1^\circ\text{C}$ впродовж 24 год. з подальшим концентруванням до $20,0\text{--}30,0$ млрд мк.кл./см³, змиванням клітин стерильним фізіологічним розчином NaCl (рН 7,0–7,2) та виділенням препаратів сумарних мембранних фракцій (СМФ) відповідно.

Колоїдні дисперсії NPMe синтезували за оригінальним протоколом в Інституті біологічної хімії ім. Ф.Д.Овчаренка НАН України за методом хімічної конденсації шляхом відновлення відповідних солей металів у водному середовищі (Перцов, 1976), який дозволяє отримувати стійкі водні дисперсії наночастинок певного розміру.

Середній розмір NPMе обчислювали за використання методу лазерно-кореляційної спектроскопії (ЛКС) («Zetasizer-3»; «Malvern Instruments Ltd», Великобританія) (Rawle, 1993). Візуалізацію зображень NPMе проводили за методом трансмісійної електронної мікроскопії (ТЕМ) («JEM-1230», «JEOL», Японія).

В роботі було використано наночастинки Ауруму (NPAu) із середнім розміром ~20 нм, ~30 нм і ~45 нм та наночастинки Аргентуму (NPAg) із розміром ~30 нм з вихідною концентрацією в колоїдній дисперсії золю 38,6 мкг/см³ та 86,4 мкг/см³ за металом відповідно.

Препарати сумарних мембранних фракцій бактеріальних клітин одержували методом диференційного центрифугування (Трахтенберг та ін., 2013): клітини змивали з поверхні чашок середовищем А наступного складу: 0,25 М сахароза, 25 мМ Трис-НСІ, 2 мМ ЕДТА (рН 7,4). Ресуспендування клітин проводили у середовищі А, суспензію обробляли ультразвуком із охолодженням впродовж 3 хв (6•30 сек) (дезінтегратор УЗДН-1, 22 кГц, сила анодного струму 0,4–0,7 А, резонансні умови); осаджування СМФ проводили шляхом центрифугування при 10000 об/хв. протягом 15 хв. з подальшим ресуспендуванням осаду (СМФ) в середовищі зберігання Б наступного складу: 20 мМ Трис-НСІ, 3 мМ MgCl₂ (рН 7,4).

Препарати СМФ характеризували за вмістом білка методом О.Н. Lowry et al. (Miller, 1959) та зберігали за температури мінус 20,0±1,0°C; повторного заморожування не допускали. Як стандартний білок для побудови калібрувальної кривої використовували бичачий сироватковий альбумін (BSA).

Дослідження рівня біохімічних показників проводили у СМФ бактеріальних клітин (у кінцевій кількості білка 150–200 мкг/см³) за умов преінкубації з дослідними зразками NPAu і NPAg (у кінцевій концентрації 1,16 і 2,59 мкг/см³ за металом відповідно) впродовж 3 хв. за температури 37±1°C у порівнянні з їх рівнем у інтактних клітин («контроль»).

У «контрольну» пробу замість NPMе додавали 20 мМ Трис-НСІ буфер.

У ізольованих СМФ бактеріальних клітин досліджували інтенсивність процесів ПОЛ за визначенням концентрації його продуктів: первинних – дієнових кон'югатів (ДК) і кінцевих – малонового діальдегіду (МДА) – у гептан-ізопропанольних екстрактах (1:1), як описано в роботі (Гаврилов, Мишкорудная, 1985). Спектр поглинання кон'югованих дієнових структур і малонового діальдегіду реєстрували спектрофотометрично («SHIMADZU UV – 1800», Японія) за довжини хвиль 233 нм і 247 нм відповідно. Розрахунок вмісту ДК проводили, приймаючи молярний коефіцієнт Е рівним 2,2•10⁵ мкмоль, та виражали у мкмоль/дм³. Значення рівня МДА виражали у одиницях питомого поглинання у 1,0 см³.

Інтенсивність ОМБ у СМФ бактеріальних клітин оцінювали за визначенням рівня утворення карбоксильних похідних нейтрального (НХ) і основного характеру (ОХ) за методикою (Арчаков, Михосоев, 1998), яка ґрунтується на здатності радикальних залишків аліфатичних амінокислот утворювати альдегідні й кетонні групи та 2,4-динітрофенілгідрозони. Карбонільні похідні НХ і ОХ мають спектр поглинання за довжини хвиль 370 нм та 430 нм відповідно. Розрахунок проводили, приймаючи значення молярного коефіцієнту Е фенілгідрозонів рівним 2,1•10⁴ М⁻¹см⁻¹, та виражали у ммоль/г білка за 1 год.

Стан показників АОС оцінювали за активністю каталази (КФ 1.11.1.6) за методом з використанням Н₂О₂ (Короліук, 1988), який здатний утворювати з амонію молібдатом стійкий забарвлений комплекс у середовищі, яке містить 0,04412 N розчин Н₂О₂, 0,01 N розчин КН₂РО₄, 0,1 М Трис-НСІ буфер (рН 7,4), 4,5% розчин амонію молібденовокислого, за температури 37,0±1,0°C, та який має спектр поглинання за довжини хвилі 410 нм. Розрахунок активності каталази проводили, приймаючи коефіцієнт оптичної густини Н₂О₂ рівним 22,2•10⁶, та виражали у мкмоль Н₂О₂/дм³ за 1 хв.

Рівень показника загальної АOA ліпідів, екстрагованих із СМФ бактеріальних клітин визначали, як описано в роботі (Клебанов и др., 1988), за ступенем їх здатності гальмувати накопичення ТБК-активних продуктів пероксидації з використанням модельної системи суспензії жовткових ліпопротеїдів, яка є стабільною у фосфатному буфері (рН 7,45) впродовж 14 діб за температури мінус 20,0±1,0°C та піддається швидкому окисненню за умов індукції 25 мМ розчином заліза сірчаноокислого у 0,002 N розчині НСІ. Комплекс ТБК-активних продуктів має спектр поглинання за довжини хвилі 535 нм. Рівень показника загальної АOA виражали у % інгібіції накопичення ТБК-активних продуктів пероксидації.

Статистичний аналіз результатів проводили за допомогою пакета прикладних програм

Microsoft Excel 2003 (for Windows XP) з використанням t-критерію Стюдента ($p < 0,05$). Для одержання статистично вірогідних результатів під час виконання досліджень на ізолюваних СМФ бактеріальних клітин визначення зазначених параметрів проводили у 5-кратній повторності з 3 паралельними пробами зразків.

Результати та обговорення

З метою оцінювання впливу NPMe на ізолювані СМФ клітин *E. coli* було синтезовано зразки NPAu середнього розміру ~ 20 нм, ~ 30 нм і ~ 45 нм та і NPAg розміром ~ 30 нм.

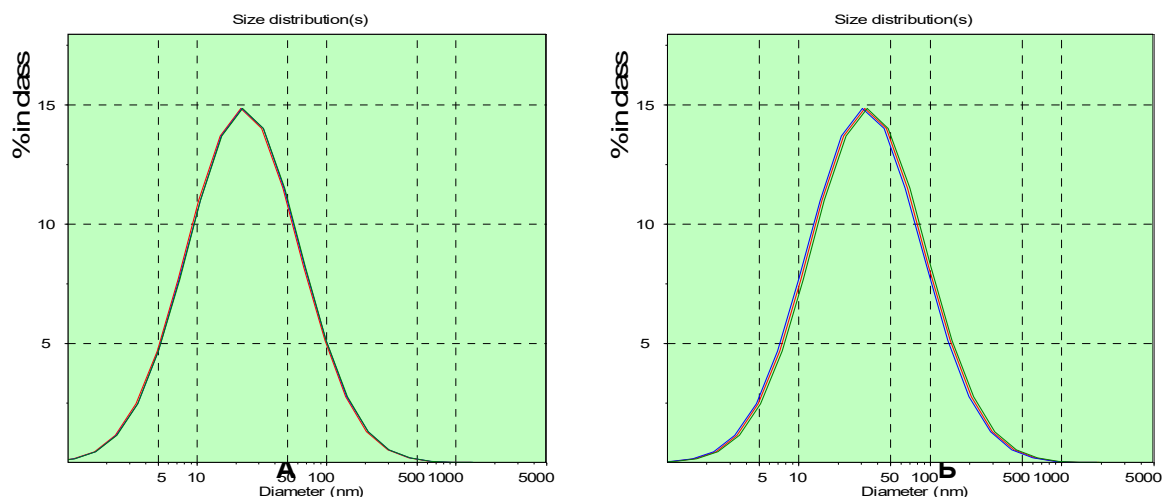


Рис. 1. Розподіл NPAu середнього розміру ~ 20 нм ($21,80 \pm 0,23$) нм (А) і ~ 30 нм ($32,80 \pm 1,30$) нм (Б) за гідродинамічним діаметром (дані ЛКС; «Malvern Instruments Ltd», Великобританія)

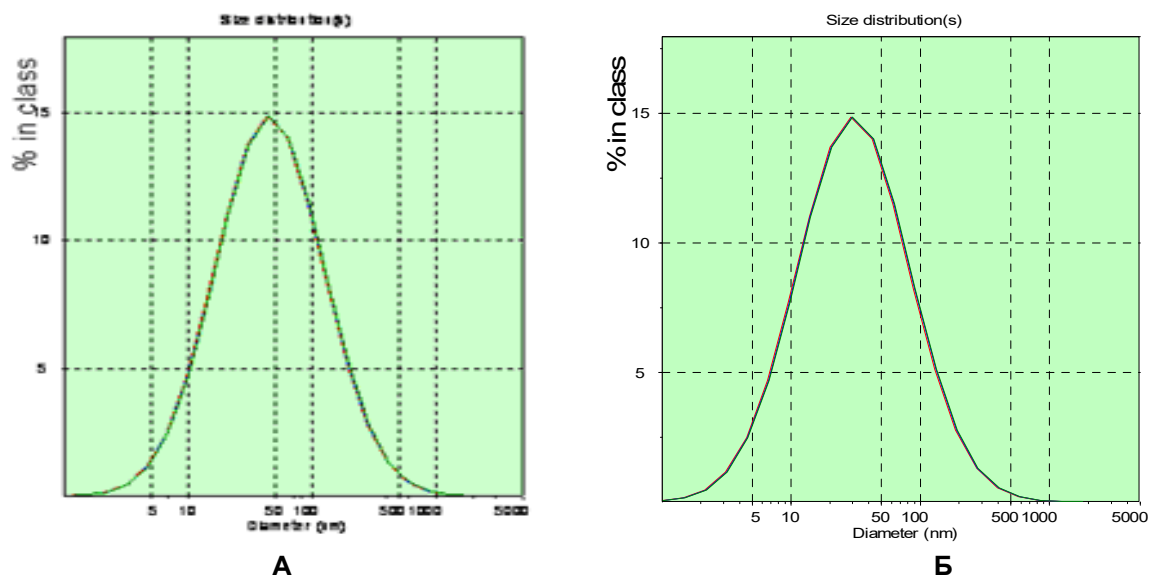


Рис. 2. Розподіл NPAu середнього розміру ~ 45 нм ($45,20 \pm 0,40$) нм (А) і NPAg розміру ~ 30 нм ($30,40 \pm 0,50$) нм (Б) за гідродинамічним діаметром (дані ЛКС; «Malvern Instruments Ltd», Великобританія)

На рис. 1 і 2 наведено типові зображення розподілу дослідних NPAu і NPAg відповідно певного розміру за їх гідродинамічним діаметром. У випадку монодисперсних систем метод ЛКС дозволяє з високою точністю визначити константи швидкості дифузії частинок, а також обчислити їх гідродинамічний діаметр, виходячи з припущення щодо сферичної геометрії цих частинок (Rawle, 1993).

Розмір та геометрію отриманих препаратів NPMe також встановлювали за використання методу трансмісійної електронної мікроскопії (ТЕМ). На рис. 3 наведено типові електронно-мікроскопічні зображення дослідних зразків NPAu і NPAg.

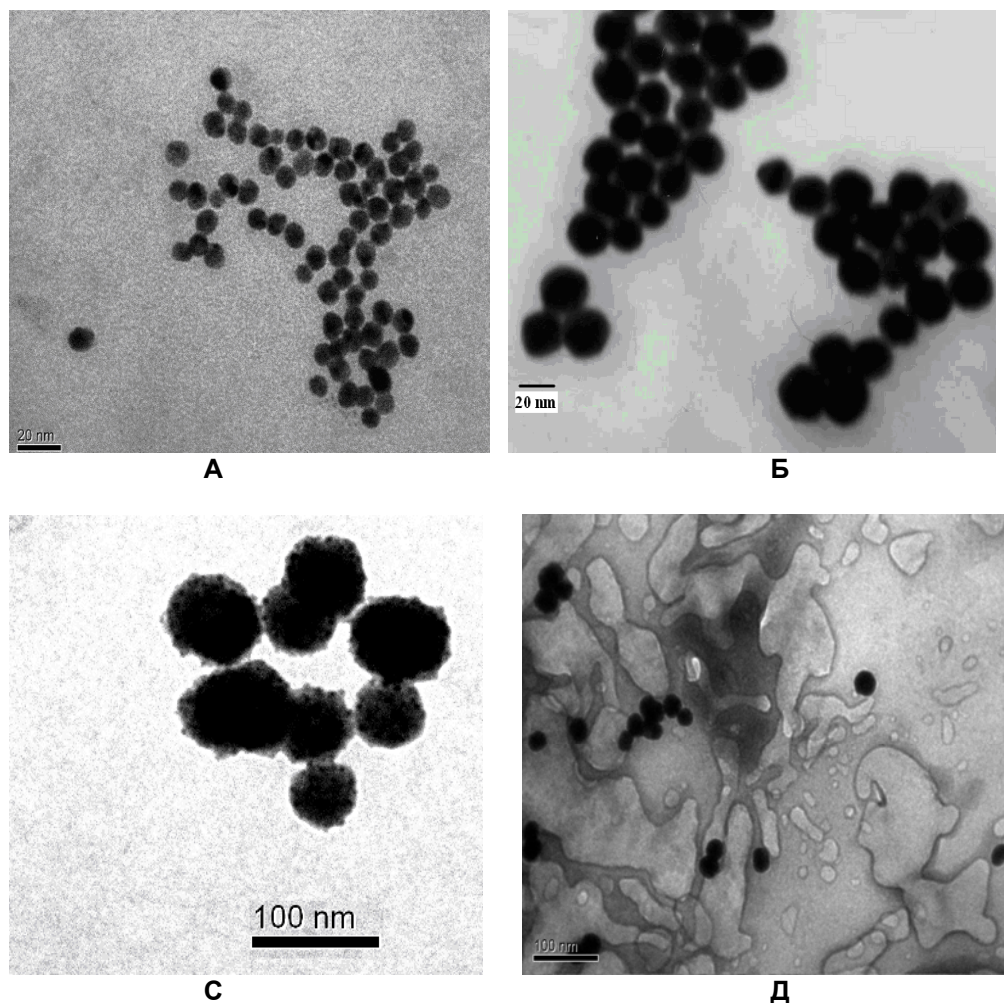


Рис. 3. Дослідні зразки NPAu середнього розміру ~20 нм (А), ~30 нм (Б) і ~45 нм (С) та NPAg розміру ~30 нм (Д) (дані TEM; JEM-1230, «JEOL», Японія; величина збільшення $\times 14\,000$)

Таким чином, використані методи ЛКС і TEM дозволили надати характеристику дискретного розміру та сферичної геометрії дослідних зразків NPMe, які були нами використані у подальших дослідженнях по контактній взаємодії з ізолюваними препаратами СМФ клітин *E. coli* різних штамів.

Дослідження рівня інтенсивності окиснювальних процесів у ізолюваних СМФ клітин *E. coli* дослідних штамів свідчать, що за рівнем утворення продуктів ліпопероксидації – ДК і МДА – більш інтенсивнішою активністю ПОЛ відрізняються мембрани клітин штаму 25 (табл. 1), а за рівнем карбоксильних похідних НХ і ОХ – більш виражені процеси ОМБ у мембранах клітин штамів 25 і 20 відповідно (табл. 2).

Таблиця 1.
Інтенсивність процесів ПОЛ у інтактних СМФ клітин *E. coli* дослідних штамів («контроль») та за умов преінкубації з NPAu і NPAg у розмірному діапазоні ($M \pm m$; $n=5$)

Вміст продуктів ПОЛ у СМФ клітин	Умови інкубації				
	Інтактні СМФ («контроль»)	За умов взаємодії з NPMe, середній розмір			
		NPAu, ~20 нм	NPAu ~30 нм	NPAu ~45 нм	NPAg ~30 нм
<i>E. coli</i> штаму 57					
ДК, мкмоль/дм ³	31,00±0,50	34,22±0,90*	33,20±1,90	79,80±2,50*	61,80±4,05*
МДА, ΔD	4,80±0,20	6,40±0,30*	4,96±0,35	10,20±1,00*	9,12±0,45*
<i>E. coli</i> штаму 25					
ДК, мкмоль/дм ³	54,40±1,45	20,80±2,03*	10,80±0,9*	13,00±1,41*	20,80±3,00*
МДА, ΔD	7,20±0,52	2,00±0,12*	0,60±0,02*	1,44±0,10*	1,66±0,25*
<i>E. coli</i> штаму 24					
ДК, мкмоль/дм ³	23,60±2,70	24,60±1,20	26,60±2,00	24,60±0,90	26,60±2,50
МДА, ΔD	3,20±0,09	3,40±0,20	3,60±0,48	3,40±0,08	3,60±0,08
<i>E. coli</i> штаму 20					
ДК, мкмоль/дм ³	30,80±2,05	31,21±3,03	26,40±1,21*	29,80±1,50	26,43±1,22*
МДА, ΔD	4,40±0,25	4,40±0,30	3,60±0,30*	4,00±0,32	3,80±0,06*

Примітка. У цієї та наступних табл.: * – різниця значень показника вірогідна при $p \leq 0,05$ відносно значень такого показника у інтактних СМФ клітин *E. coli* відповідних штамів («контроль»).

Таблиця 2.
Інтенсивність процесів ОМБ у інтактних СМФ клітин *E. coli* дослідних штамів («контроль») та за умов преінкубації з NPAu і NPAg у розмірному діапазоні ($M \pm m$; $n=5$)

Вміст карбоксильних похідних у СМФ клітин	Умови інкубації				
	Інтактні СМФ («контроль»)	За умов взаємодії з NPMe, середній розмір			
		NPAu ~20 нм	NPAu ~30 нм	NPAu ~45 нм	NPAg ~30 нм
<i>E. coli</i> штаму 57					
НХ, ммоль/г білка/год.	2,12±0,05	2,61±0,07*	1,93±0,01	2,81±0,05*	1,44±0,01*
ОХ, ммоль/г білка/год.	1,06±0,02	1,52±0,03*	0,92±0,01*	1,48±0,03*	0,98±0,01
<i>E. coli</i> штаму 25					
НХ, ммоль/г білка/год.	4,17±0,20	3,04±0,05*	4,12±0,50	4,40±0,41	1,38±0,01*
ОХ, ммоль/г білка/год.	2,98±0,12	1,94±0,11*	2,82±0,52	2,10±0,15*	0,92±0,01*
<i>E. coli</i> штаму 24					
НХ, ммоль/г білка/год.	1,30±0,18	0,86±0,04*	0,91±0,06*	0,37±0,01*	0,60±0,02*
ОХ, ммоль/г білка/год.	0,80±0,01	0,44±0,02*	0,61±0,03*	0,30±0,01*	0,36±0,01*
<i>E. coli</i> штаму 20					
НХ, ммоль/г білка/год.	3,20±0,08	3,88±0,15*	1,19±0,02*	1,06±0,04*	1,37±0,09*
ОХ, ммоль/г білка/год.	1,43±0,04	1,65±0,07*	0,55±0,01*	0,53±0,01*	0,71±0,04*

Аналіз характеру впливу NPAu і NPAg на інтенсивність процесів ПОЛ за умов преінкубації з ізольованими СМФ клітин *E. coli* дослідних штамів дозволив виявити певні дискретні значення розмірів дослідних зразків NPMe (табл. 1).

Так, встановлено, що за преінкубації NPAu середнього розміру ~20 нм і ~45нм та NPAg ~30 нм з СМФ клітин *E. coli* штаму 57 встановлено підвищення рівня ДК і МДА, що у середньому

складало 10,3 і 33,3%, 157,4 і 112,5% та 99,4 і 90,0% ($p \leq 0,05$) відносно значень показників для інтактних СМФ клітин («контроль»).

У препаратах ізольованих СМФ клітин *E. coli* штамів 25 і 20, навпаки, визначали уповільнення утворення продуктів ПОЛ під впливом дослідних зразків NPMe.

Так, зниження вмісту ДК і МДА реєстрували в СМФ клітин штаму 25 за преінкубації з наночастинками обох металів у всьому вивченому розмірному діапазоні, що складало в середньому 3,6 і 6,3 рази ($p \leq 0,05$) відповідно відносно значень таких показників для інтактних СМФ клітин («контроль»). Зниження вмісту ДК і МДА визначали в СМФ *E. coli* штаму 20 лише за умов контактної взаємодії з NPAu та NPAg середнього розміру ~ 30 нм, відсоток якого складав у середньому 14,3% і 18,2% та 14,2% і 13,6% відповідно ($p \leq 0,05$), відносно значень цих показників у «контрольній» пробі.

Встановлено, що за умов преінкубації зразків наночастинок металів обох видів з СМФ клітин *E. coli* штаму 24 у вивченому розмірному діапазоні не встановлювали статистичних змін рівня показників ДК і МДА відносно таких у «контрольній» пробі.

Результати визначення інтенсивності процесів ОМБ у ізольованих СМФ клітин *E. coli* дослідних штамів за умов преінкубації з дослідними зразками NPMe в розмірному діапазоні наведені у табл. 2. З отриманих даних виявляється, що рівень утворення карбоксильних похідних нейтрального і основного характеру залежить від дискретного розміру дослідних зразків NPMe.

Так, за преінкубації NPAu середнього розміру ~ 20 нм та ~ 45 нм з СМФ клітин штаму 57 встановлено збільшення рівня НХ і ОХ у середньому на 23,1% і 43,4% та на 32,6% і 39,6% ($p \leq 0,05$), а за впливу NPAu та NPAg розміром ~ 30 нм, навпаки, зниження їх рівня на 9,0% і 13,2% ($p \leq 0,05$) та на 32,1% ($p \leq 0,05$) і 7,5% відповідно відносно значень показників карбоксильних похідних у інтактних СМФ клітин цього штаму («контроль»).

У СМФ клітин штамів 25, 24 і 20 за умов контактної взаємодії з NPMe обох видів у цілому визначено гальмування інтенсивності процесів ОМБ за зниженням рівня значень їх похідних. Так, за впливу NPAu і NPAg зниження рівня похідних НХ у СМФ клітин цих штамів варіювало в межах 1,37–3,01 і 2,20–3,02 рази, а ОХ – у межах 1,30–2,70 і 2,01–3,24 рази ($p \leq 0,05$) відповідно.

Виняток складає відсутність вірогідних змін рівня утворення карбоксильних похідних у СМФ клітин штаму 25 за взаємодії з NPAu середнього розміру ~ 30 нм і ~ 45 нм, тобто процеси ОМБ за інтенсивністю наближались до таких у інтактних СМФ клітин цього штаму («контроль»).

Встановлено, що за умов контактної взаємодії NPAu середнього розміру ~ 20 нм з СМФ клітин штаму 57 і 20 реєстрували підвищення вмісту похідних НХ та ОХ у середньому на 23,1% і 21,3% та на 43,4% і 15,4% ($p \leq 0,05$) відносно значень показників у «контрольних» пробах. Також за умов впливу NPAu середнього розміру ~ 45 нм у СМФ клітин штаму 57 реєстрували накопичення вмісту НХ і ОХ, збільшення значень яких дорівнювало в середньому 32,5% і 39,6% відповідно відносно «контрольних» значень показників.

На рис. 4 наведені результати визначення показників, що характеризують стан АОС захисту мембран клітин *E. coli* дослідних штамів 57 (А), 25 (Б), 24 (С) і 20 (Д) за умов впливу NPMe у розмірному діапазоні.

Встановлено, що у СМФ клітин штаму 25 (рис. 4, Б) рівень активності каталази за умов преінкубації з NPAu у всьому розмірному діапазоні вірогідно знижувався в межах 1,3–8,6 рази, а у клітин штаму 20 (рис. 4, Д), навпаки, підвищувався – у межах 1,3–1,9 рази відносно контрольних значень ензиму.

У СМФ штамів 57 і 24 (рис. 4, А і С) за умов преінкубації з NPAu середнього розміру ~ 30 нм і ~ 45 нм активність каталази знижувалась у середньому в 1,6 і 2,9 рази ($p \leq 0,05$), а для клітин штаму 20 (рис. 4, Д) за дії таких NPMe у всьому діапазоні розмірів – збільшувалась в межах 1,3–1,9 рази ($p \leq 0,05$) відносно її «контрольних» значень.

Встановлено тенденцію щодо збільшення активності каталази на 6,7% у СМФ клітин штаму 57 (рис. 4, А, 1) у випадку взаємодії NPAu середнього розміру ~ 20 нм, що для СМФ клітин штаму 24 (рис. 4, С, 1) було вірогідним і складало в середньому 18,1% ($p \leq 0,05$) відносно «контрольного» рівня ензиму.

Рівень активності каталази за умов преінкубації NPAg середнього розміру ~ 30 нм з СМФ клітин штаму 25 (рис. 4, Б, 4) суттєво знижувався за значенням у середньому в 4,9 рази ($p \leq 0,05$), а штамів 57, 24 і 20 (рис. 4, А, С і Д) – підвищувався в 1,1, 1,5 і 2,2 рази ($p \leq 0,05$) відповідно відносно ферментативної активності у «контрольній» пробі.

Рівень показника загальної АОА ліпідів СМФ бактеріальних клітин за взаємодії з NPAu та NPAg у всьому розмірному діапазоні збільшувався для штамів 25, 24 і 20 (рис. 4, Б, С і Д), кратність чого складала у середньому 3,0, 1,8 і 1,3 раза та 3,0, 2,0 і 1,7 раза ($p \leq 0,05$) відповідно відносно «контрольних» значень показника.

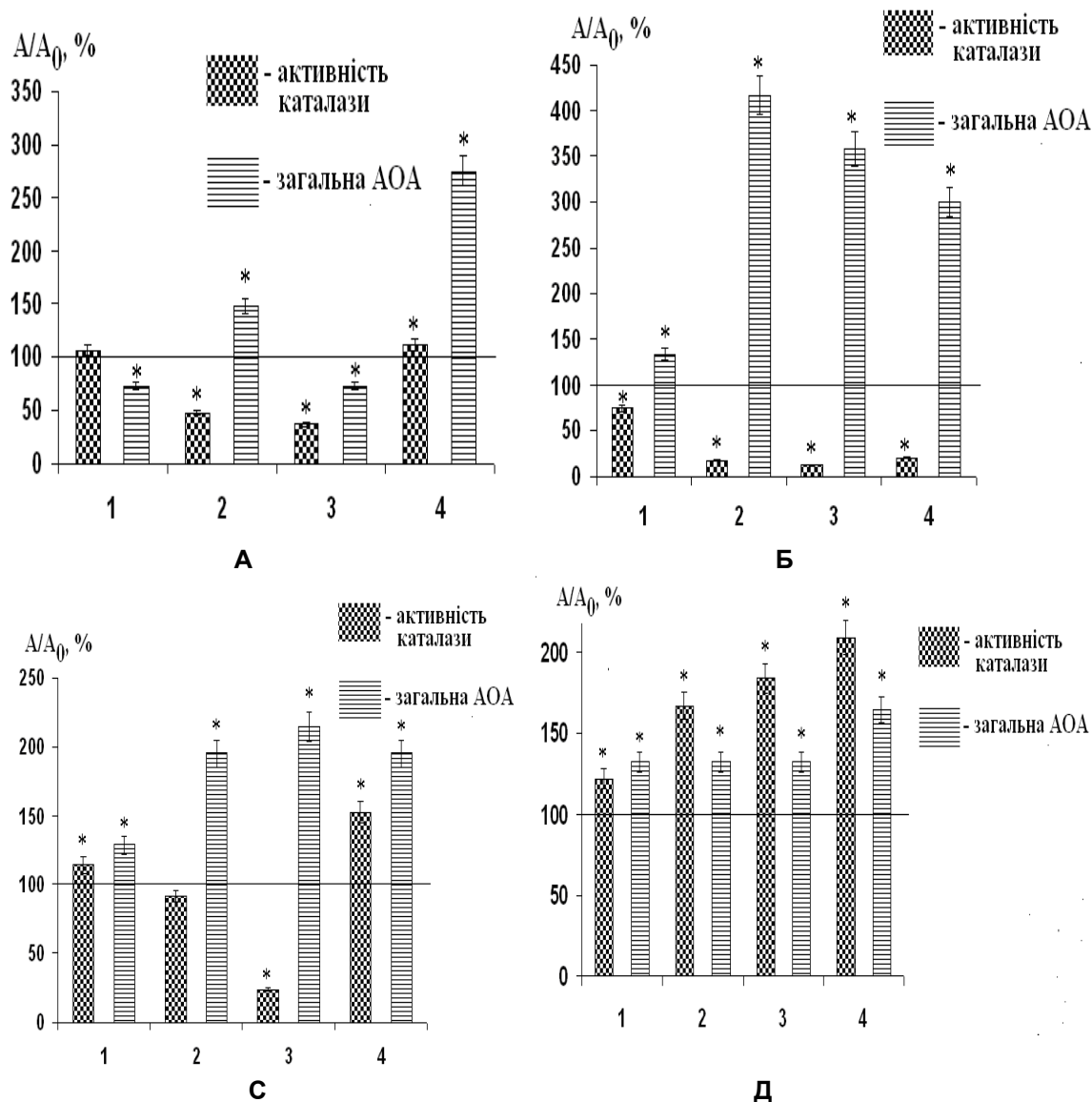


Рис. 4. Рівень показників АОС (активність каталази та загальна АОА ліпідів) у СМФ клітин *E. coli* штамів 57 (А), 25 (Б), 24 (С) і 20 (Д) за умов преінкубації з NPAu і NPAg в розмірному діапазоні ($n=5$)

Примітка. NPAu середнього розміру ~ 20 нм (1), ~ 30 нм (2) і ~ 45 нм (3) у концентрації $1,16$ мкг/см³ за металом та NPAg середнього розміру ~ 30 нм (4) у концентрації $2,59$ мкг/см³ за металом; за 100% прийняте значення показників АОС у інтактних СМФ клітин *E. coli* відповідного штаму за відсутності впливу NPMe («контроль»); * – різниця значень показника вірогідна при $p \leq 0,05$ відносно значень такого показника у інтактних СМФ клітин *E. coli* відповідних штамів («контроль»).

Збільшення значень показника загальної АOA в ізольованих СМФ клітин штаму 57 реєстрували лише за впливу NPAu і NPAg середнього розміру ~30 нм (рис. 4, А, 3, 4), кратність якого дорівнювала у середньому 1,5 і 2,8 рази ($p \leq 0,05$) відповідно відносно рівня даного показника в «контрольній» пробі.

Так, виражені зміни інтенсивності процесів ліпопероксидації та процесів окисної модифікації білків у мембранних фракціях клітин *E. coli* дослідних штамів за умов контактної взаємодії з NPAu і NPAg супроводжувались втручанням реакцій загальної АOC за підвищення рівня загальної АOA та змінами активності каталази ($p \leq 0,05$), що, очевидно, призводило до гальмування утворення токсичних продуктів ПОЛ (*E. coli* штамів 20 і 25) та утримання їх на рівні «контрольних» значень (*E. coli* штамів 20 і 24), а також до зниження вмісту карбоксильних похідних ОМБ (*E. coli* штамів 57, 25, 24 і 20) відповідно.

Відомо, що наночастинки різного хімічного походження, у тому числі – наночастинки металів, можуть виступати як в ролі про-, так і антиоксидантів (Prylutska et al., 2008; Jia et al., 2009; Injac et al., 2009; Johnston et al., 2010; Cornejo-Garrido et al., 2011; Фальфушинська та ін., 2013).

Дійсно, біологічна дія NPMe пов'язана з регуляторним впливом на систему антиокиснювального захисту мембран бактеріальних клітин. Але визначене нами збільшення рівня загальної АOA на фоні зниження або посилення каталази, що належить до ферментативної ланки АOC, можна розглядати як індукцію структурних ендогенних антиоксидантів (аскорбат, SH-групи, GSH, церулоплазмін, цитохром, металотіонеїни тощо). При цьому витрачання потужності АО-ферментів може частково компенсуватися пулом неферментативної ланки АOC. Відомо, що через високий вміст сульфгідрильних нуклеофільних груп металотіонеїни здатні реагувати з електрофільними субстанціями, такими як іони металів і вільні радикали (Stoliar, Falfushynska, 2012; Sutherland et al., 2012; Scheringer, 2008; Tedesco et al., 2010; Фальфушинська та ін., 2013). Можна припустити, що в результаті зв'язування з функціональними групами металотіонеїнів іонів металів, які в процесі біотрансформації вивільнилися із міцели колоїдної наночастинки, гіпотетично токсичність цих металів зменшується, тоді як незв'язані – можуть вступати в інші взаємодії та акумулюватися клітинами та їх структурами, які визначають їх біосумісність (у даному випадку – антиоксидантні властивості) або токсичність (прооксидантні властивості).

Визначений фізіологічний рівень або уповільнення інтенсивності процесів окиснення ліпідів та окисної деструкції білків у СМФ клітин *E. coli* усіх дослідних штамів за взаємодії з NPAu та з NPAg (за винятком штаму 57) середнього розміру ~30 нм може вказувати на значну біосумісність таких наночастинок саме у цьому розмірі через їх антиоксидантний вплив. У роботах (Карамушка и др., 1990, Karamushka et al., 1991; Ульберг та ін., 2005, 2008; Pan et al., 2012) доведено здатність деяких інтактних мікроорганізмів селективно концентрувати NPAu розміром 20–30 нм на поверхні клітин, яка дозволяє здійснювати ресуспендування останніх у розчин, при цьому зі збільшенням часу контакту наночастинок і клітини фізична адгезія на поверхні клітин переходить у хімічну взаємодію за участі функціональних груп на поверхні клітинної мембрани, зокрема карбоксильних COOH^- та тиолових SH $^-$. Поряд із можливим зв'язуванням з функціональними групами металотіонеїнів іонів металів, які в процесі біотрансформації вивільнилися із міцели колоїдної наночастинки, інші автори (Данилович та ін., 2004, 2007) зазначають, що при дослідженні особливостей взаємодії NPAu з металофільними клітинами *Bacillus* spp. в їх оболонках був виділений глікопротеїд з $M. m.$ 50 кДа, який характеризувався здатністю активно зв'язувати NPMe завдяки наявності в своїй структурі позитивно заряджених аміногруп NH_2^+ . Такі структурні компоненти виступають як своєрідні клітинні рецептори, що сприяють процесу специфічної взаємодії клітини з наночастинами Ауруму.

Як опосередковано, так й напряму через процеси нормалізації вільнорадикального окиснення ліпідів активно блокується цитолітичний синдром (Sahoo et al., 2007; Chen et al., 2008; Bawa, 2008; Johnston et al., 2010). У цьому випадку NPAu і NPAg виступають як антиоксиданти – «пастки» радикалів та їх можна вважати біосумісними і мембранотропними.

Природу цих властивостей можна пояснити тим, що міцела колоїдної наночастинки металу, яка має потенціалутворюючу оболонку з розвиненою питомою поверхнею, має слабо негативний заряд, що дозволяє наночастинкам проявляти високу адсорбційну і каталітичну активність до різного роду токсичних метаболітів навколо і усередині клітинної мембрани, ґрунтується на механізмах рецептор-опосередкованого ендоцитозу та фізико-хімічного зв'язування NPMe

функціональними групами компонентів клітинної мембрани (Ульберг, 2005; Ульберг та ін., 2008; Dukhin et al., 2010; Науменко та ін., 2016; Стойка та ін., 2017).

Феномен тропності NPMe до біологічних молекул різної молекулярної маси, шляхи їх трансмембранного переносу всередину клітини, біотрансформації та біодеградації мають геометрично- та розмірно-залежний характер (Oberdorster et al., 2005; Cornejo-Garrido et al., 2011), що визначає варіабельність характеру їх біологічної дії – від токсичності до біосумісності. Цей феномен значною мірою залежить від розміру та форми наночастинок, що пов'язано з площею поверхні та квантумними ефектами. Так, зменшення розміру наночастинок призводить до того, що, порівняно із внутрішнім вмістом, значно більша частина атомів – складових наночастинок знаходиться на поверхні. Низкою авторів доведено, що зі зміною розміру колоїдних NPMe з невеликим кроком, особливо тих, які мають сферичну геометрію, площа їх питомої поверхні збільшується в геометричній прогресії (на порядки разів) через зростання співвідношення площі поверхні до маси частинки, що пояснює обернено пропорційну залежність прояву токсичності наночастинок від її розміру – чим менше за розміром частинка, тим більше агресивна (біодоступна) (Dukhin et al., 2010; Shukla et al., 2005). Але більшим за розміром наночастинкам властиво утворювати токсичні (агресивні) конгломерати як між собою, так і з гідрофільним ліпідним бішаром та аміногрупами білкових молекул мембрани і плазмалеми, в результаті чого на їх поверхні збільшується кількість гідрофобних залишків, утворюються міжмолекулярні ковалентні зв'язки, які вбудовуються у внутрішній гідрофобний прошарок, підвищуючи його специфічну провідність і ємність та додатково штучно ініціюючи каскад ланцюгових реакцій за вільнорадикальним типом (Colon et al., 2009; Шекунова и др., 2013; Dubertret et al., 2002; Lowry et al., 2012).

Так, дійсно, у випадку контактної взаємодії NPAu середнього розміру ~20 і ~45 нм та NPAg середнього розміру ~30 нм з СМФ клітин штаму 57 реєстрували посилення інтенсивності процесів ПОЛ і ОМБ, а за взаємодії NPAu розміру ~20 нм з клітинами штаму 20 – процесів ОМБ відповідно. Отримані ефекти свідчать про прооксидантну і мембранотоксичну дію NPAu і NPAg у саме цих розмірах. Очевидно, потенціал власних АО-ресурсів у клітинних мембранах таких штамів виявився недостатнім, тому беззаперечним є факт індивідуального характеру впливу NPMe на функціональний стан бактеріальних клітин в межах одного таксономічного виду. Отже, прооксидантний вплив NPAu меншого (~20 нм) і більшого (~45 нм) розміру ілюструє очевидну мембранотоксичну дію наночастинок певного розміру. Так доведено, що NPAu розміру 1,4 і 5,0 нм викликали значно сильніший оксидний стрес, ніж частинки металу більшого діаметра (Pan et al., 2009; Dubertret et al., 2002). Так, у двостулкового морського молюска *Scrobicularia plana* за інкубації з NPAu розміром ~5, ~15 і ~40 нм спостерігалась акумуляція Ауруму в тканинах, яка поєднувалась з активацією ензимів АОЗ – каталази (~15 і ~40 нм), супероксиддисмутази (~40 нм) та глутатіон-S-трансферази (~5, ~15 і ~40 нм).

За дії NPAg розміром ~30 нм на СМФ *E. coli* штаму 57 у випадку активації процесів ліпопероксидації на фоні відсутності ознак оксидного ураження протеїнів стрес має швидше сигнальний характер, а за дії NPAu розміром ~20 нм на СМФ *E. coli* штаму 20 визначена активація ОМБ на фоні фізіологічного рівня процесів ПОЛ – руйнівний характер (Jia et al., 2009). Так, деградовані протеїни можуть знаходитися в клітинах годинами і навіть днями, а продукти ПОЛ піддаються детоксикації вже через декілька хвилин (Кенія, 1991). Одержані дані дозволяють розглядати окиснювання білків як відносно стабільний показник окиснювального стресу, що має величезне значення для дослідницької практики. Слід зазначити також, що важливим аспектом з'ясування впливу наночастинок металів на системи АОС є встановлення залежності її реакції від вихідного редокс-статусу саме клітини.

Підсумовуючи вищесказане, слід зауважити, що потенційна небезпечність дослідних NPMe носить залежний від їх дискретного розміру характер та є індивідуальною для різних штамів у межах одного таксономічного виду мікроорганізмів, з іншого боку – конкретні механізми біосумісності або цитотоксичної дії NPMe виокремити складно, бо вони можуть сильно відрізнитись навіть у межах одного класу наноматеріалів, тому це питання поки ще має дискусійний характер.

Висновки

1. Встановлено, що дослідні зразки NPAu і NPAg середнього розміру ~30 нм за дії на мембранні фракції клітин *E. coli* усіх дослідних штамів (за винятком штаму 57) сприяють уповільненню та/або утриманню на фізіологічному рівні інтенсивності процесів окиснення ліпідів та

окисної деструкції білків, що супроводжується втручанням реакцій загальної АОС за підвищенням рівня загальної АОА та змінами активності каталази ($p \leq 0,05$) та дозволяє стверджувати про мембранотропні властивості таких NРМе; використання їх надає можливість створити новий засіб управління структурно-функціональним станом бактеріальних клітин.

2. У випадку контактної взаємодії NРАu середнього розміру ~ 20 і ~ 45 нм та NРАg середнього розміру ~ 30 нм з СМФ клітин штаму 57 реєстрували посилення інтенсивності процесів ПОЛ і ОМБ, а за взаємодії NРАu розміру ~ 20 нм з клітинами штаму 20 – процесів ОМБ відповідно, що вказує на прооксидантну і мембранотоксичну дію NРАu і NРАg саме у цих розмірах.

3. Отже, потенційна небезпечність та біосумісність NРМе носить залежний від їх дискретного розміру характер та є індивідуальною для різних штамів у межах одного таксономічного виду мікроорганізмів.

Автор висловлює подяку к.б.н. Т.Г.Грузині та к.б.н. Л.С.Резніченку (Інститут біологічної хімії ім. Ф.Д.Овчаренка НАН України) за допомогу у синтезі наночастинок металів.

Список літератури

- Абрамов Н.В., Багацкая А.Н., Барвинченко В.Н. и др. Наноматериалы и наноконпозиты в медицине, биологии и экологии. – Киев: Наук. думка, 2011. – 444с. /Abramov N.V., Bagatskaya A.N., Barvinchenko V.N. i dr. Nanomaterialy i nanokompozity v meditsine, biologii i ekologii. – Kiev: Nauk. dumka, 2011. – 444s./
- Арчаков А.И., Михосоев И.М. Модификация белков активным кислородом и их распад // Биохимия – 1998. – Т.54, №2. – С. 179–186. /Archakov A.I., Mikhosoyev I.M. Modifikatsiya belkov aktivnym kislородом i ikh raspad // Biokhimiya. – 1998. – Т.54, no. 2. – S. 179–186./
- Беленічев І.Ф., Левицький Є.Л., Губський Ю.І. та ін. Антиоксидантна система захисту організму (огляд) // Современные проблемы токсикологии. – 2002. – №3. – С. 24–31. /Belenichev I.F., Levyts'kyi Ye.L., Gubs'kyi Yu.I. ta in. Antyoksydantna systema zakhystu organizmu (oglyad) // Sovremennyye problemy toksikologii. – 2002. – No. 3. – S. 24–31./
- Гаврилов В.Б., Мишкорудная М.И. Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови // Лаб. дело. – 1985. – №3. – С. 33–35. /Gavrilov V.B., Mischkorudnaya M.I. Spektrofotometricheskoye opredeleniye soderzhaniya gidroperekisey lipidov v plazme krovi // Lab. delo. – 1985. – No. 3. – S. 33–35./
- Данилович Г.В., Грузина Т.Г., Ульберг З.Р., Костерин С.О. Вплив іонного та колоїдного золота на АТР-гідролазні ферментні системи в мембрані мікроорганізмів *Bacillus* sp. B4253 та *Bacillus* sp. B4851 // Укр. біохім. журн. – 2007. – Т.79, №4. – С. 46–51. /Danylovykh G.V., Gruzina T.G., Ul'berg Z.R., Kosteryn S.O. Vplyv ionnogo ta koloidnogo zolota na ATR-gidrolazni fermentni systemy v membrani mikroorganizmiv Bacillus sp. B4253 ta Bacillus sp. B4851 // Ukr. biokhim. zhurn. – 2007. – T.79, no. 4. – S. 46–51./
- Данилович Г.В., Грузина Т.Г., Ульберг З.Р., Костерин С.О. Ідентифікація та каталітичні властивості Mg^{2+} -залежної АТР-гідролазы плазматичних мембран *Bacillus* sp. B4253, здатних до накопичення золота // Укр. біохім. журн. – 2004. – Т.76, №5. – С. 45–51. /Danylovykh G.V., Gruzina T.G., Ul'berg Z.R., Kosteryn S.O. Identifikatsiya ta katalitychni vlastyivosti Mg^{2+} -zaleznoi ATR-gidrolazy plazmatychnykh membran Bacillus sp. B4253, zdatnykh do nakopychennya zolota // Ukr. biokhim. zhurn. – 2004. – T.76, no. 5. – S. 45–51./
- Дубинина Е.Е. Роль активных форм кислорода в качестве сигнальных молекул в метаболизме ткани при состояниях окислительного стресса // Вопр. мед. химии. – 2001. – Т.47, №6. – С. 561–581. /Dubinina Ye.Ye. Rol' aktivnykh form kisloroda v kachestve signal'nykh molekul v metabolizme tkani pri sostoyaniyakh oksilitel'nogo stressa // Vopr. med. khimii. – 2001. – T.47, no. 6. – S. 561–581./
- Ершов Б.Г. Наночастицы металлов в водных растворах: электронные, оптические и каталитические свойства // Рос. хим. журн. – 2001. – Т. XIV, №3. – С. 20–30. /Yershov B.G. Nanochastitsy metallov v vodnykh rastvorakh: elektronnyye, opticheskiye i kataliticheskiye svoystva // Ros. khim. zhurn. – 2001. – T. XIV, no. 3. – S. 20–30./
- Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньшикова Е.Б. Окислительный стресс: биохимический и патофизиологический аспект. – М.: Маик, 2001. – 343с. /Zenkov N.K., Lankin V.Z., Men'shikova Ye.B. Oksilitel'nyy stress: biokhimicheskiy i patofiziologicheskiy aspekt. – M.: Maik, 2001. – 343s./
- Иваница В.И., Рахимова Е.Л. Жизнеспособность лиофилизированных клеток *Mucococcus xanthus* UCM 10041 и *Polyangium cellulosum* UCM 10043 в присутствии различных антиоксидантов // Микробиол. журнал – 2002. – Т.64, №5. – С. 3–9. /Ivanitsa V.I., Rakhimova Ye.L. Zhiznesposobnost' liofilizirovannykh kletok *Mucococcus xanthus* UCM 10041 i *Polyangium cellulosum* UCM 10043 v prisutstvii razlichnykh antioksidantov // Microbiol. zhurnal – 2002. – T.64, no. 5. – S. 3–9./
- Карамушка В.И., Ульберг З.Р., Грузина Т.Г. Роль мембранных процессов в накоплении Au (III) и Au (0) бактериями // Укр. біохім. журн. – 1990. – Т.62, №1. – С. 76–82. /Karamuschka V.I., Ul'berg Z.R., Gruzina T.G. Rol' membrannykh protsessov v nakoplenii Au (III) i Au (0) bakteriyami // Ukr. biokhim. zhurn. – 1990. – T. 62, no. 1. – S. 76–82./

- Кения М.В. Динамика свободнорадикальных процессов и продуктов азотистого катаболизма в тканях системы крови при гипероксии. Автореф. дисс. ... канд. биол. наук / 03.00.04 – биохимия. – Ростов-на-Дону, 1991. – 19с. /Kenya M.V. Dinamika svobodnoradikal'nykh protsessov i produktov azotistogo katabolizma v tkanyakh sistemy krovi pri giperoksii. Avtoref. diss. ...cand. biol. nauk / 03.00.04 – biokhimiya. – Rostov-na-Donu, 1991. – 19s./
- Клебанов Г.И., Бабенкова И.В., Теселкин Ю.О. и др. Оценка антиокислительной активности плазмы крови с применением желточных липопротеидов // Лаб. дело. – 1988. – №5. – С. 59–62. /Klebanov G.I., Babenkova I.V., Teselkin Yu.O. i dr. Otsenka antiokislitel'noy aktivnosti plasmy krovi s primeneniym zheltochnykh lipoproteidov // Lab. delo. – 1988. – No. 5. – S. 59–62./
- Королюк М.А. Определение активности каталаз // Лаб. дело. – 1988. – №1. – С. 16–18. /Korolyuk M.A. Opredeleniye aktivnosti katalaz // Lab. delo. – 1988. – No. 1. – S. 16–18./
- Методические разработки к практикуму по коллоидной химии / Под ред. А.В.Перцова. – М.: Изд-во МГУ им. М.В.Ломоносова, 1976. – С. 126–130. /Metodicheskiye razrabotki k praktikumu po kolloidnoy khimii / Pod red. A.V.Pertsova. – M.: Izd. MGU im. M.V.Lomonosova, 1976. – S. 126–130./
- Науменко А.М., Нипирко О.Ю., Цимбалюк О.В. та ін. Молекулярний докінг нанорозмірного матеріалу діоксину титану із зовнішньоклітинною частиною ГАМКБ-рецептора // Біол. студії. – 2016. – Т.10 (3). – С. 5–16. /Naumenko A.M., Nipirko O.Yu., Tsimbalyuk O.V. ta in. Molekulyarnyy doking nanorozmirnogo materialu dioksynu tytanu iz zovnishn'oklitynnoyu chastynoyu GAMKB-retseptora // Studia Biologica. – 2016. – T.10 (3). – S. 5–16./
- Стойка Р.С. Багатофункціональні наноматеріали для біології і медицини: молекулярний дизайн, синтез і застосування. – К.: «Наукова думка», 2017. – 361с. /Stoyka R.S. Bagatofunktsional'ni nanomaterialy dlya biologii i medytyny: molekulyarnyy dizayn, syntezi i zastosuvannya. – K.: «Naukova dumka», 2017. – 361s./
- Трахтенберг І.М., Ульберг З.Р., Чекман І.С. та ін. Методичні рекомендації: Оцінка безпеки лікарських нанопрепаратів. – Київ, 2013. – 108с. /Trakhtenberg I.M., Ul'berg Z.R., Chekman I.S. ta in. Metodychni rekomendatsii: Otsinka bezpeky likars'kykh nanopreparativ. – Kyiv, 2013. – 108s./
- Турпаяев К.Т. Активные формы кислорода и экспрессия генов // Биохимия. – 2002. – Т.67, вып.3. – С. 339–352. /Turpayev K.T. Aktivnyye formy kisloroda i ekspressiya genov // Biokhimiya. – 2002. – T.67, vyp.3. – S. 339–352./
- Ульберг З.Р. Коллоидно-химические свойства биологических наносистем. Биомембраны. В: Коллоидно-химические основы нанонауки. – Киев: Академперіодика, 2005. – С. 199–237. /Ul'berg Z.R. Kolloidno-khimicheskiye svoystva biologicheskikh nanosistem. Biomembrany. V: Kolloidno-khimicheskiye osnovy nanonauki. – Kiev: Akademperiodika, 2005. – P. 199–237./
- Ульберг З., Грузина Т., Карпов О. Нанотехнології в медицині: роль колоїднохімічних процесів // Вісн. Нац. акад. наук України. – 2008. – №8. – С. 28–41. /Ul'berg Z., Gruzina T., Karpov O. Nanotekhnologii v medytyni: rol' koloidnokhimichnykh protsesiv // Visn. Nats. akad. nauk Ukrainy. – 2008. – No. 8. – S. 28–41./
- Фальфушинська Г.І., Гнатишина Л.Л., Турта О.О. та ін. Функції металотіонеїнів на системі антиоксидантного захисту за дії кобальт- та цинквісних наноконкомпозитів на карася сріблястого *Carassius auratus gibelio* // Укр. біохім. журн. – 2013. – Т.85. – С. 52–61. /Fal'fushyn'ska G.I., Gnatyshyna L.L., Turta O.O. ta in. Funktsii metalotioneiniv na systemy antioksidantnogo zakhystu za dii kobal't- ta tsinkvmisnykh nanokompozytiv na karasya sriblyastogo *Carassius auratus gibelio* // Ukr. biokhim. zhurn. – 2013. – T.85. – S. 52–61./
- Феофилова Е.П. Изменения в углеводном и липидном составе мицелия *Cunninghamella japonica* во время длительного высокотемпературного стресса // Микробиология. – 1993. – Т.62, №1. – С. 62–69. /Feofilova Ye.P. Izmeneniya v uglevodnom i lipidnom sostave mitseliya *Cunninghamella japonica* vo vremya dlitel'nogo vysokotemperaturnogo stressa // Microbiologiya. – 1993. – T.62, no. 1. – S. 62–69./
- Харчук І.А. Анабіоз: основні поняття і супроводжуючі його процеси (обзор) // Екологія моря. – 2005. – Вып.70. – С. 62–78. /Kharchuk I.A. Anabioz: osnovnyye ponyatiya i soprovozhdayushhiye protsessy (obzor) // Ekologiya morya. – 2005. – T.70. – S. 62–78./
- Чекман І.С., Ульберг З.Р., Маланчук О.В. та ін. Нанонаука, нанобіологія, нанофармація. – Київ: Поліграф плюс, 2012. – 327с. /Chekman I.S., Ul'berg Z.R., Malanchuk O.V. ta in. Nanonauka, nanobiologiya, nanofarmatsiya. – Kyiv: Poligraf plyus, 2012. – 327s./
- Чекман І.С., Сердюк А.М., Кундієв Ю.І. та ін. Нанотоксикологія: напрямки досліджень (огляд) // Довкілля та здоров'я. – 2009. – Т.48, №1. – С. 3–7. /Chekman I.S., Serdyuk A.M., Kundiyev Yu.I. ta in. Nanotoksikologiya: napryamky doslidzhen' (oglyad) // Dovkillya ta zdorov'ya. – 2009. – T.48, no. 1. – S. 3–7./
- Шекунова Т.О., Гиль Д.О., Иванова О.С. и др. Синтез, биологическая и фотокаталитическая активность зольей диоксида церия, стабилизированных цитрат-ионом // Наносистемы: физика, химия. Математика. – 2013. – Т.4, no. 2. – С. 83–89. /Shekunova T.O., Gil' D.O., Ivanova O.S. i dr. Sintez, biologicheskaya i fotokataliticheskaya aktivnost' zoley dioksida tseriya, stabilizirovannykh tsitrat-ionom // Nanosistemy: fizika, khimiya. Matematika. – 2013. – T.4, no. 2. – S. 83–89./
- Bawa R. Nanoparticle-based therapeutics in humans: a survey // Nanotechnology Law & Business. – 2008. – Vol.5, no. 2. – P.135–155.

- Beker M.J., Rapoport A.J., Zikmanis P.B., Damberg B.E. Dehydration as a yeast metabolism regulating factor // *Environmental regulation of microbial metabolism* / Ed. By I.S.Kulaev et al. – London etc.: Acad. Press, 1985. – P. 105–111.
- Brunner Tobias J., Wick P., Mauser P. *In vitro* cytotoxicity of oxide nanoparticles: comparison to asbestos, silica, and the effect of particle solubility // *Environ. Sci. And Technol.* – 2006. – Vol.40, no. 14. – P. 4374–4381.
- Chen Po.C., Mwakwari S.C., Oyelere A.K. Gold nanoparticles: from nanomedicine to nanosensing // *Nanotechnology, Science and Application.* – 2008. – No. 1. – P. 45–66.
- Chen Z., Meng H., Hing G. Acute toxicological affects of copper nanoparticles *in vivo* // *The Journal of Physical Chemistry. Toxicology Letters.* – 2006. – Vol.163. – P. 109–120.
- Colon J., Herrera L., Smith J. Protection from radiation induced pneumonitis using cerium oxide nanoparticles // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine.* – 2009. – Vol.5. – P. 225–231.
- Cornejo-Garrido H., Kibanova D., Nieto-Camacho A. et al. Oxidative stress, cytotoxicity, and cell mortality induced by nano-sized lead in aqueous suspensions // *Chemosphere.* – 2011. – Vol.84. – P. 1329–1335.
- Dubertret B., Skourides P., Norris D.J. et al. *In vivo* imaging of quantum dots encapsulated in phospholipid micelles // *Science.* – 2002. – Vol. 298. – P. 1759–1762.
- Dukhin A.S., Ulberg Z.R., Karamushka V.I., Gruzina T.G. Peculiarities of live cells' interaction with micro- and nanoparticles // *Advances in Colloid and Interface Science.* – 2010. – Vol.159. – P. 60–71.
- Garçon G., Dagher Z., Zerimech F. et al. Dunkerque City air pollution particulate matter-induced cytotoxicity, oxidative stress and inflammation in human epithelial lung cells (L132) in culture // *Toxicology in Vitro.* – 2006. – Vol.20 (4). – P. 519–528.
- Injac R., Radic N., Govedarica B. et al. Acute doxorubicin pulmototoxicity in rats with malignant neoplasm is effectively treated with fullereneol C₆₀(OH)₂₄ through inhibition of oxidative stress // *Pharm. Reports.* – 2009. – Vol.61. – P. 335–342.
- Jia G., Wang H., Yan L. Cytotoxicity of carbon nanomaterials: single-wall nanotube, and fullerene // *Environ. Sci. Technol.* – 2005. – Vol.39. – P. 1378–1380.
- Jia H.Y., Liu Y., Zhang X.J. et al. Potencial oxidative stress of gold nanoparticles by induced-NO releasing in serum // *J. of the Am. Ch. Society.* – 2009. – Vol.131. – P. 40–41.
- Johnston H.J., Hutchison G., Christensen F.M. et al. A review of the *in vivo* and *in vitro* toxicity of silver and gold particulates: Particle attributes and biological mechanisms responsible for the observed toxicity // *Critical Reviews in Toxicology.* – 2010. – Vol.40. – P. 328–346.
- Karamushka V.I., Ullberg Z.R., Grusina T.G., Dukhin A.S. ATP-dependent gold accumulation by living *Chlorella* cells // *Acta Biotechnol.* – 1991. – Vol.11, no. 3. – P. 197–203.
- Li N., Sioutas C., Cho A., Schmitz D. Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage // *Environ. Health Perspec.* – 2003. – Vol.111. – P. 455–459.
- Lowry G.V., Gregory K.B., Apte S.C., Lead J.R. Transformations of nanomaterials in the environment // *Environmental Science Technology.* – 2012. – Vol. 46. – P. 6893–6899.
- Lynch I., Cedervall T., Lundqvist M. The nanoparticle-protein complex as a biological entity; a complex fluids surface science challenge for the 21st century // *Adv Colloid Interface Sci.* – 2007. – Vol.31. – P. 167–174.
- Miller G.L. Protein determination for large numbers of samples // *Anal. Chem.* – 1959. – Vol.31, no. 5. – P. 964–966.
- Oberdorster G., Oberdorster E., Oberdorster J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles // *Environmental Health Perspectives.* – 2005. – No. 7 (113). – P. 823–839.
- Pan Y.F., Buffet P.E., Poirier L. et al. Size dependent bioaccumulation and ecotoxicity of gold nanoparticles in an endobenthic invertebrate: the Tellinid clam *Scrobicularia plana* // *Environmental Pollution.* – 2012. – Vol.168. – P. 37–43.
- Pan Y., Leifert A., Ruau D. et al. Gold nanoparticles of diameter 1.4 μm trigger necrosis by oxidative stress and mitochondrial damage // *Small.* – 2009. – Vol.5. – P. 2067–2076.
- Powers Kevin W., Brown Scott C. Characterization of nanoscale particles for toxicological evaluation // *Toxicol. Science.* – 2006. – Vol.90, no. 2. – P. 296–303.
- Prylutska S.V., Grynyuk I.I., Matyshevska O.P. et al. Anti-oxidant properties of C₆₀ fullerenes *in vitro* // *Fullerene, Nanotubes and Carbon Nanostructures.* – 2008. – Vol.16. – P. 698–705.
- Rawle A. Basic principles of particle size analysis. Malvern Instruments Limited. (www.malvern.co.uk)

- Sahoo S.K., Parveen S., Panda J.J. The present and future of nanotechnology in human health care // *Nanomedicine*. – 2007. – No. 3. – P. 20–31.
- Scheringer M. Nanoecotoxicology: Environmental risks of nanomaterials // *Nature Nanotechnology*. – 2008. – Vol.3. – P.322.
- Sherman D.R., Sabo P.J., Hickey M.J. et al. Disparate responses to oxidative stress in saprophytic and pathogenic micobacteria // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. – 1995. – Vol.92. – P. 6625–6629.
- Shukla R., Bansal V., Chaudhary M. Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: a microscopic overview // *Langmuir*. – 2005. – Vol.21, no. 23. – P. 10644–10654.
- Shvedova A.A., Kisin E., Murray A.R. Exposure of human bronchial cells to carbon nanotubes caused oxidative stress cytotoxicity // *Proceedings of the Society for free radical research meeting. European Section*. – 2004. – P. 91–103.
- Stoliar O.B., Falfushynska H.I. Metallothionein of aquatic animals as a biomarker: coverage of vulnerability // *Global J. Env. Science Technology*. – 2012. – Vol.2, no. 5. – P.115.
- Sutherland D.E., Summers K.L., Stillman M.J. Noncooperative metalation of metalothionein Ia and its isolated domains // *Biochemistry*. – 2012. – Vol.51. – P. 6690–6700.
- Tedesco S., Doyle H., Blasco J. et al. Oxidative stress and toxicity of gold nanoparticles in *Mytilus edulis* // *Aquatic Toxocology*. – 2010. – Vol.100. – P. 178–186.
- West J.L., Halas N.J. Application of nanotechnology to biotechnology // *Current Opinion in Biotechnology*. – 2000. – Vol.11. – P. 215–217.
- Weyermann J., Lochmann D., Zimmer A. A practical note on the use of cytotoxicity assays // *Int. J. Pharm.* – 2005. – No. 288. – P. 369–376.
- Yamakoshi Y., Umezawa N., Ryu A. et al. Active oxygen species generated from hotoexcited fullerene (C₆₀) as potential medicines: O₂ – versus O₂ // *J. Am. Chem. Soc.* – 2003. – Vol.125. – P. 12803–12809.

Представлено: В.М.Войціцький, Н.С.Кавок / Presented by: V.M.Voytsitskiy, N.S.Kavok

Рецензент: Є.Е.Перський / Reviewer: Ye.E.Persky

Подано до редакції / Received: 30.10.2017