



УДК 546.284-31:543.42

© 2012

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

### **Влияние дисперсности нанокремнеземов на их биоактивность по отношению к гаметам быка**

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

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

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

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

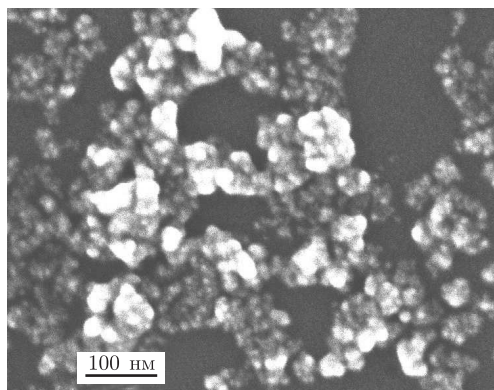


Рис. 1. Электронная микрофотография агломерата аэросила А-300 (45) размером 5 мкм

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

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

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

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

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

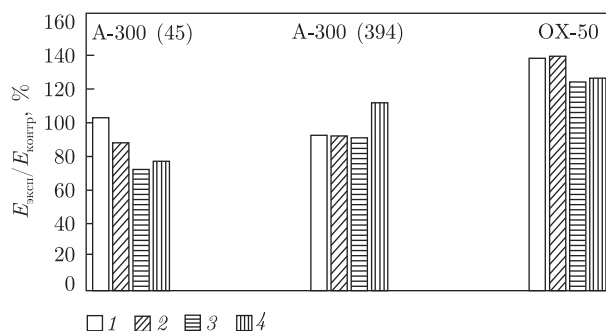


Рис. 2. Зависимость энергии движения деконсервированных гамет быка в присутствии разных форм кремнезема от их концентрации, %: 1 — 0,0025; 2 — 0,01; 3 — 0,004; 4 — 0,16

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

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

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

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

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

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

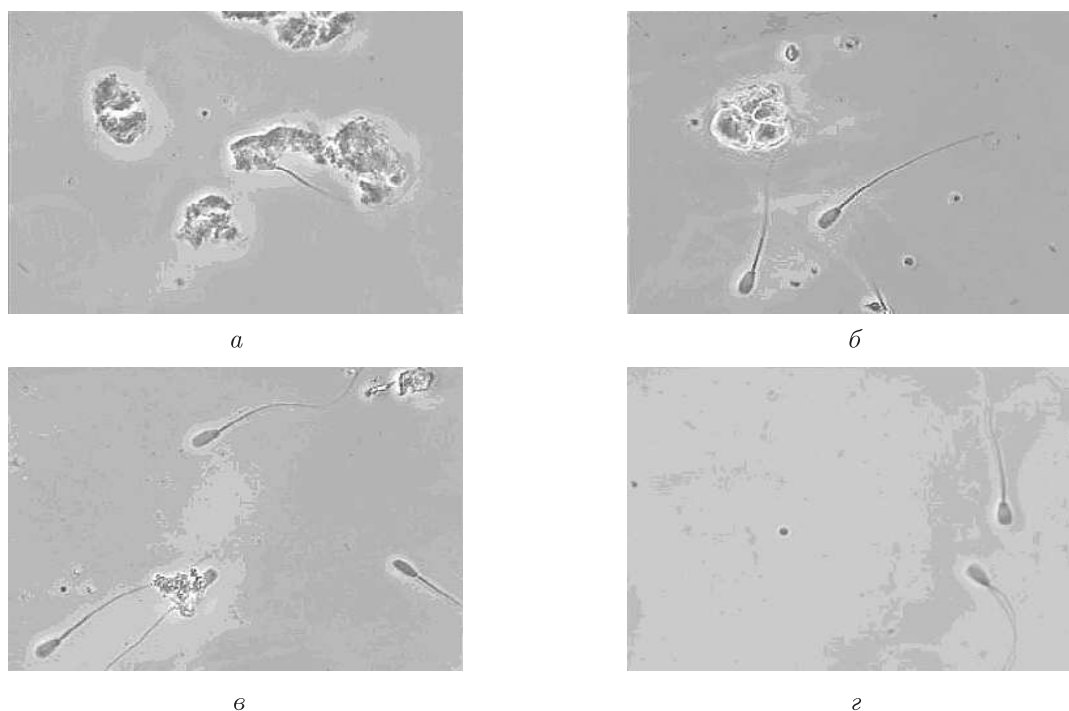


Рис. 3. Деконсервированные гаметы быков в присутствии разных форм кремнезёмов: а — А-300 (45) ( $C_{\text{SiO}_2} = 0,04\%$ ); б — А-300 (394) ( $C_{\text{SiO}_2} = 0,04\%$ ); в — ОХ-50 ( $C_{\text{SiO}_2} = 0,03\%$ ); г — контроль (клетки без добавления кремнезёмов)

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

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

Таблица 1

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

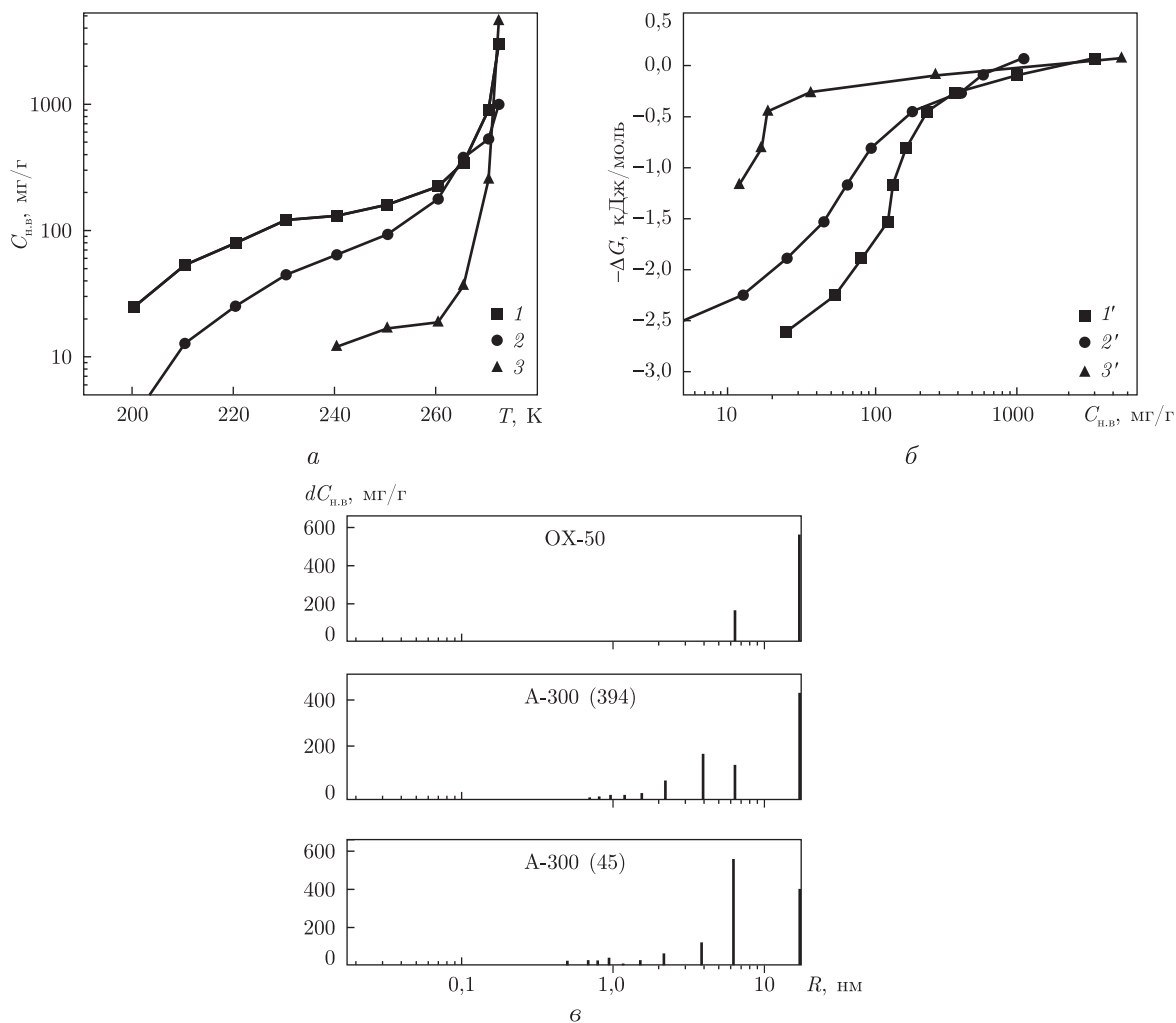


Рис. 4. Зависимости: *a* — концентрации незамерзающей воды от температуры; *б* — изменения свободной энергии Гиббса от концентрации незамерзающей воды [кривые: 1, 1' — А-300 (45); 2, 2' — А-300 (394); 3, 3' — ОХ-50]; *в* — распределения по радиусам кластеров межфазной воды для смоченных водой порошков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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

*Поступило в редакцию 11.11.2011*

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

**Вплив дисперсності нанокремнеземів на їх біоактивність по відношенню до гамет бика**

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

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

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

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