

УДК 619:579.864.1

Л. С. РЄЗНІЧЕНКО, кандидат біологічних наук
С. М. ДИБКОВА, кандидат біологічних наук
Інститут біологічної хімії ім. Ф.Д. Овчаренка НАН України, м. Київ
В.П. РИЖЕНКО, доктор ветеринарних наук, професор, член-кореспондент НААН
С.А. НИЧИК, доктор ветеринарних наук
Г.Ф. РИЖЕНКО, кандидат біологічних наук
О.І. ГОРБАТЮК, кандидат ветеринарних наук
В.О. АНДРІЯЩУК, кандидат ветеринарних наук
Інститут ветеринарної медицини НААН, м. Київ

БІОТЕХНОЛОГІЯ НАНОВАКЦИН. ЕЛЕКТРОННО-МІКРОСКОПІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ КОНТАКТНОЇ ВЗАЄМОДІЇ НАНОЧАСТИНОК СРІБЛА З МІКРООРГАНІЗМАМИ

У статті наведені результати електронно-мікроскопічних досліджень особливостей контактної взаємодії сферичних наночастинок срібла 30 нм з клітинами аеробних та анаеробних штамів мікроорганізмів – компонентів вакцинних препаратів. Установлено виражена акумуляція наночастинок срібла як на поверхні, так і всередині аеробних та анаеробних бактеріальних клітин уже після 10 хвилин контактної взаємодії у поживному середовищі.

Ключові слова: наночастинок срібла, аеробні бактеріальні клітини, анаеробні бактеріальні клітини, взаємодія, акумуляція.

Унікальні фізико-хімічні властивості та висока біологічна активність наночастинок металів обумовлюють широкі можливості їх застосування у різних галузях діяльності людства. Зокрема, наночастинок металів активно використовуються у практиці медицини, фармакології та ветеринарії з метою створення високоефективних лікарських засобів та діагностиків нового класу [1, 2]. Значного розвитку набуває застосування нанорозмірних металів у нанобіотехнологіях з метою стимуляції основних фізіолого-біохімічних показників виробничих штамів мікроорганізмів та підвищення ефективності імунобіологічних препаратів різних класів [3, 4].

У нанобіотехнологічній галузі серед усіх існуючих типів наночастинок металів найбільш широке застосування сьогодні знайшли наночастинок золота [5]. Наночастинок срібла до цього часу досліджувались менш активно і, перш за все, у напрямку їх застосування як ефективного антимікробного агенту [6]. Разом з тим, останні дослідження засвідчили, що наночастинок срібла певного розмірного та концентраційного діапазону здатні виражено стимулювати ключові фізіолого-біохімічні властивості низки бактеріальних штамів [7]. У цьому руслі надзвичайної актуальності набуває питання визначення механізмів контактної взаємодії наночастинок срібла з клітинами мікроорганізмів.

Метою роботи було електронно-мікроскопічне дослідження особливостей контактної взаємодії наночастинок срібла з аеробними і анаеробними бактеріальними клітинами – компонентами вакцинних препаратів.

Матеріал і методи досліджень. Об'єктом досліджень слугували виробничі штами мікроорганізмів *E. coli*, *Act. lignieresii*, *Cl. perfringens* тип А, *F. necrophorum* – компоненти вакцинних препаратів - з колекції лабораторії анаеробних інфекцій ІВМ НААН України. Субстанція сферичних наночастинок срібла 30 нм, використана у роботі, була синтезована методом хімічної конденсації у водному середовищі в ІБКХ ім. Ф.Д. Овчаренка НАН України за оригінальним протоколом шляхом відновлення нітрату срібла. Синтезована субстанція наночастинок срібла являє собою водну дисперсію жовто-коричневого кольору з концентрацією 80 мкг/мл за металом. Субстанція наночастинок срібла охарактеризована як біобезпечна згідно тестів Методичних рекомендацій МОЗ України «Оцінка безпеки лікарських нанопрепаратів».

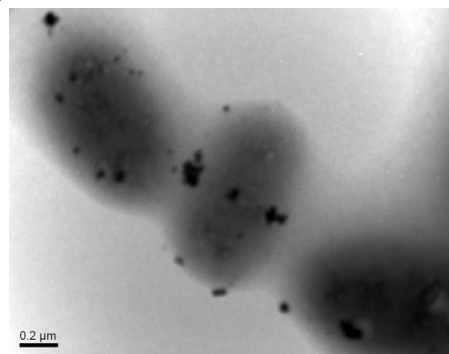
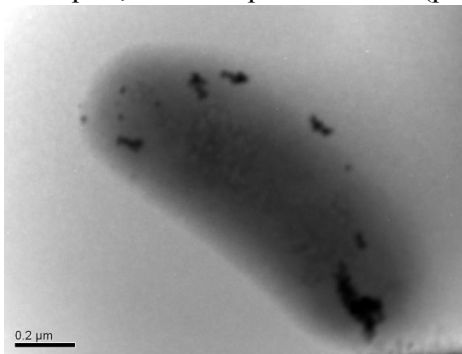
Візуалізацію особливостей контактної взаємодії наночастинок срібла з клітинами аеробних та анаеробних штамів мікроорганізмів здійснювали методом трансмісійної електронної мікроскопії (JEM-1230, «JEOL», Японія). Препарати не контрастували.

Результати досліджень. Існуючі відомості щодо особливостей контактної взаємодії наночастинок металів з прокариотичними і еукаріотичними клітинами свідчать, що одним з визначальних факторів у цих процесах є природа, форма, розмір та метод отримання наночастинок.

Субстанція сферичних наночастинок срібла 30 нм, використана у даній роботі, синтезована колоїдно-хімічним методом. На відміну від фізичних технологій, цей метод дозволяє синтезувати монодисперсні, стійкі до коагуляції наночастинок заданого розмірного діапазону без застосування додаткових стабілізаторів, що дозволяє підвищити біобезпечність та біосумісність наночастинок за контакту з біологічними клітинами.

Для отримання електронно-мікроскопічних зображень до суспензії клітин у відповідному поживному середовищі додавали дисперсію наночастинок срібла та інкубували суміш протягом 10 хвилин. Після чого суміш клітин з наночастинками срібла осаджували центрифугуванням протягом 5 хвилин при 6000 об/хв, осад ресуспендували у 3% розчині глютарового альдегіду на фосфатному буфері. Аліквоти отриманих суспензій наносили на підготовлені бленди, висушували за кімнатної температури та проводили електронну мікроскопію отриманих препаратів.

Проведені електронно-мікроскопічні дослідження неконтрастованих препаратів бактеріальних клітин після 10 хвилин контактної взаємодії з наночастинками срібла дозволили виявити значну кількість електронно-щільних включень як на поверхні, так і всередині клітин (рис. 1).



А

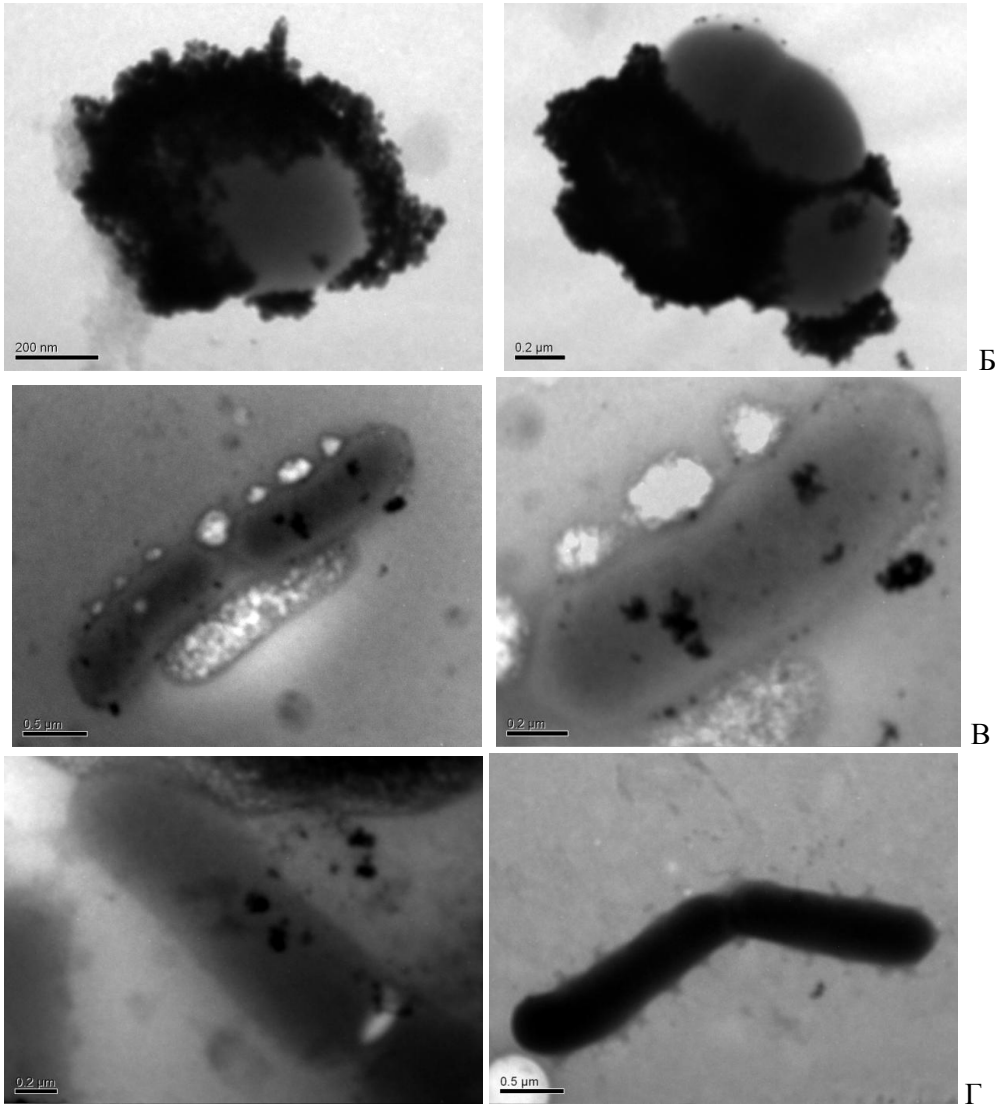


Рис. 1. Бактеріальні клітини штамів *E.coli* (А), *Act. lignieresii* (Б), *Cl. perfringens* тип А (В), *F. necrophorum* (Г) після 10 хв. контакту з наночастинками срібла 30 нм у поживному середовищі (препарати не контрастовані)

Отримані електронно-мікроскопічні зображення є свідченням високої афінності субстанції наночастинок срібла 30 нм до досліджених бактеріальних клітин. Особливої уваги заслуговує і факт ефективної акумуляції субстанції як аеробними, так і анаеробними клітинами, яка супроводжується активною біо-трансформацією наночастинок срібла.

Висновки.

1. Як аеробні, так і анаеробні бактеріальні клітини виявляють здатність до активної акумуляції наночастинок срібла 30 нм.

2. Виражена акумуляція сферичних наночастинок срібла 30 нм відбувається як на поверхні, так і всередині бактеріальних клітин – компонентів вакцинних препаратів уже після 10 хвилин контактної взаємодії у поживному середовищі.

3. Контактна взаємодія бактеріальних клітин з наночастинками срібла супроводжується активною біотрансформацією останніх.

4. Виявлені найбільш виражені акумулятивні властивості щодо наночастинок срібла у *Act. lignieresii*.

Перспективи подальших досліджень. Заслужують на увагу дослідження з метою розкриття фізіолого-біохімічних особливостей взаємодії мікроорганізмів і наночастинок.

Список використаної літератури:

1. Sahoo S.K. The present and future of nanotechnology in human health care / S. K. Sahoo, S. Parveen, J. J. Panda // *Nanomedicine*. – 2007. – No. 3. – P. 20-31.
2. West J.L. Application of nanotechnology to biotechnology / J.L. West, N.J. Halas // *Curr. Opin. Biotechnol.* – 2000. – Vol. 11. – P. 215-217.
3. Merroun M.L. Interactions between metals and bacteria: fundamental and applied research / M. L. Merroun // *FORMATEX*. – 2007. – P. 108-119.
4. Ушкалов В.О. Результати комісійних досліджень вакцини проти сибірки тварин із штаму *Bacillus anthracis* Sterne 34F2 / В.О.Ушкалов [та ін.] // *Науковий вісник ветеринарної медицини*. – 2011. – Вип. 7 (83). – С. 102-108.
5. Дыкман Л.А. Наночастицы золота: получение, функционализация, использование в биохимии и иммунохимии / Л.А. Дыкман, В.А. Богатырев // *Успехи химии*. – 2007. – Т. 76, № 2. – С. 199-213.
6. Нанонаука, нанобіологія, нанофармація. Монографія / Під ред. І.С. Чекаман [та інш] – К.: Поліграф плюс, 2012. – 327 с.
7. Романько М.Є. Вплив наночастинок золота та срібла на АТР-азну активність нативних і регідратованих клітин *Escherichia coli* / М.Є. Романько, [та інш] // *Укр. біохім. журн.* – 2009. – т. 81, № 6. – С. 70-76.

БИОТЕХНОЛОГИЯ НАНОВАКЦИН. ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИИ КОНТАКТНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА С МИКРООРГАНИЗМАМИ. / Резниченко Л. С., Дыбкова С. Н., Рыженко В. П., Нычик С. А., Рыженко Г. Ф., Горбатюк О. И., Андрияшук В. А.

В статье представлены результаты электронно-микроскопических исследований особенностей контактного взаимодействия сферических наночастиц серебра 30 нм с клетками аэробных и анаэробных штаммов микроорганизмов – компонентов вакцинных препаратов. Установлена выраженная аккумуляция наночастиц серебра как на поверхности, так и внутри аэробных и анаэробных бактериальных клеток уже после 10 минут контактного взаимодействия в питательной среде.

Ключевые слова: наночастицы серебра, аэробные бактериальные клетки, анаэробные бактериальные клетки, взаимодействие, аккумуляция.

BIOTECHNOLOGY NANO VACCINES. ELECTRON MICROSCOPIC STUDY CONTACT INTERACTION OF SILVER NANOPARTICLES WITH MICROORGANISMS. / Reznitchenko L.S., Dybkova S.N., Rizhenko V.P., Nychyk S.A., Rizhenko G.F., Gorbatyuk O.I., Andriyashchuk V.A .

The article presents the results of electron-microscopic studies of the peculiarities of 30 nm silver nanoparticles' contact interaction with cells of aerobic and anaerobic microorganisms' strains - components of vaccine preparations. It has been revealed the silver nanoparticles' evident accumulation on the surface as well as within aerobic and anaerobic bacteria cells already after 10 minutes of contact interaction in the growth medium.

Key words: silver nanoparticles, aerobic bacteria cells, anaerobic bacteria cells, interaction, accumulation.

Рецензент – доктор ветеринарних наук В. Л.Коваленко.

Рукопис надійшов 27. 02. 2014 року.