

УДК 616-093/-098:615.015.4

Н. Волошина, канд. вет. наук, П. Кілючицький, д-р біол. наук, проф.,
В. Каплуненко, д-р тех. наук, проф., М. Косінов, канд. техн. наук**НАУКОВЕ ОБҐРУНТУВАННЯ МЕХАНІЗМУ ОВОЦИДНОЇ ДІЇ НАНОЧАСТОК ОЛОВА**

*В оглядовій статті висвітлені питання застосування та особливості механізму дії наночастинок олова, що отримані методом ерозійно-вибухової нанотехнології. Узагальнюються результати експериментів із яйцями нематоди *Ascaris suum*.*

*In article questions of application and feature of the mechanism of action nanopastes the tin received by a way erozijno-vzryvnoj nanotechnology are presented. The results received in experiments with eggs *Ascaris suum*.*

На сьогодні існує можливість одержувати наноструктури практично всіх відомих хімічних елементів. Для цільового впливу на біомолекули навколо наночастинок утворюються оболонки із атомів та молекул хімічних речовин. Запропоновано багато способів отримання наночастинок з біологічно сумісними оболонками, які містять білки, ліпіди тощо. Більшість методик присвячено композиціям, в яких для попередження самовільного злипання наночастинок застосовують речовини-дисперсанти (цитрат амонію, олеїновий спирт, імідазолін), поверхнево-активні речовини тощо [1]. Такі комплекси із змішаним або моносаром є універсальною основою для створення біологічно сумісних наноматеріалів [1].

Нами досліджена дія нанорозмірних часток олова (1,0-50,0 нм), колоїд яких має слабо кислу реакцію (рН 6,7-6,9) та вміст металу від 10 до 100 мг/дм³ [2].

В попередніх досліджах нами було експериментально встановлено, що наночастки олова мають чітко виражену овоцидну дію на яйця аскарусів свиней, незалежно від ступеня розвитку зародка; виявлені особливості взаємодії між наночастиками та яйцями нематоди, що проявляються в ефекті "налипання". Доведено, що аніоноподібні аквахелати вибірково взаємодіють лише із живими яйцями нематод та не втрачають своєї ефективності при повторному застосуванні препарату наноолова [3].

Дана робота присвячена з'ясуванню механізму овоцидної дії наночастинок олова.

Фахівцями ТОВ "Наноматеріали і нанотехнології" створено висококоординаційні аніоноподібні аквахелати нанометалу олова, в яких в ролі комплексоутворювача виступають наночастинки олова з поверхневим електричним зарядом зі знаком "мінус", які оточені молекулами води. В процесі електроімпульсної абляції із локальних ділянок металевих гранул у воді утворюються наночастки, а за рахунок явища вибухової електронної емісії – потужні потоки електронів. Знаходячись в потоці електронів, наночастки набувають на своїй поверхні електричного заряду із знаком "мінус". Наночастки металів утворюють координаційні сполуки з молекулами води, які подібні металу-комплексоутворювачу у комплексних хімічних сполуках [4].

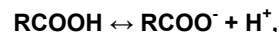
Кількість ліганд-молекул води відповідає координаційну числу у комплексних сполуках і визначається кількістю пар електронів, що знаходяться на поверхні наночастинок. Стійкість наноаквакомплексу забезпечується кулонівськими силами, що виникають між поверхнею зарядженої металевої наночастки і диполями води.

Утворена навколо наночастинок гідратна оболонка оберігає наночастки від агломерації і випадання в осад та забезпечує їх стабільність без будь-яких додаткових речовин – стабілізаторів. Величина наногідратної оболонки залежить від поверхневого заряду наночастки [1].

В Україні гідратовані наночастки металів у вигляді колоїдного розчину виготовляються промислово (ТУ У 24.6-35291116-001:2007 і ТУ У 24.6-35291116-002:2008). Їх можна використовувати в якості ефективних та екологічно безпечних дезінфікуючих і лікуючих засобів.

Для певних випадків гідратовані наночастки можна розглядати як закінчені функціональні наноматеріали, оскільки завдяки своїй наногідратній оболонці вони можуть легко проникати через мембрани клітин і "розкриватися" з оболонки, що створює умови для їх високої активності при збереженні екологічної чистоти. Це дозволяє використовувати такі наночастки усередині клітин для посилення або гальмування певних метаболічних процесів, а також впливати на фізичні властивості клітин, тканин, одноклітинних і багатоклітинних організмів.

Каплуненко В.Г та Косінов М.В. розробили наночастки, що містять в якості лігандів молекули води і молекули біологічно сумісних карбонових кислот, насамперед, лимонної кислоти, що бере участь в циклі Кребса. Їх отримують шляхом додавання карбонової кислоти, наприклад, лимонної, у водний розчин, що містить гідратовані наночастки. Карбонова кислота дисоціює у водному розчині за схемою:



де R – радикал певної карбонової кислоти.

В результаті реакція середовища змінюється з нейтральної на кислу. Водний розчин містить іони водню H⁺ та іони карбоксильної групи RCOO⁻. Оскільки розмір молекули води складає величину 2,8 Å, а розмір атомів водню майже вдесятеро менше – 0,31 Å, то характер їх взаємодії із зарядженими наночастиками істотно відрізнятиметься. Крім того, маса молекули води в 18 разів більше маси іону водню, що робить її більш інертною в порівнянні з іоном водню. Тому, позитивно заряджені іони водню H⁺, утворені при дисоціації молекул карбонової кислоти, стають дуже рухомими в розчині і активно притягуються негативно зарядженими наночастиками.

Позбавлений електрону водень перетворюється на дуже малий йон, який легко проникає між молекулами води в ближню зону наночастки і може розміщуватись безпосередньо на поверхні наночастки набагато ближче, ніж молекула води. Оскільки значення сили Кулона обернено пропорційне квадрату відстані, то сила притягування йона водню H⁺ набагато перевищує силу притягування молекул води. Менші розміри іонів водню, велика їхня рухливість, менша відстань до поверхні наночастки і значно більша кулонівська сила притягування створюють значні переваги у іонів водню порівняно з молекулами води. Тож ці чинники сприяють захопленню ними приповерхневого шару електрично заряджених наночастинок і витіснення з цієї зони молекул води [5].

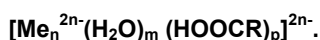
В результаті здійснюється заміщення молекул води в наногідратній оболонці йонами водню H⁺. Оскільки кулонівська сила, що утримує диполь води на поверхні наночастки, набагато менше кулонівської сили, що притягує до поверхні наночастки йон водню. Заміщенню сприяє також те, що рухливість диполів води набагато менша рухливості йонів водню H⁺.

Всі викладені вище діючі чинники призводять до того, що певна кількість молекул води в оболонках нано-

часток заміщується йонами водню H^+ . В результаті, йони водню фіксуються на поверхні наночастинок, а кількість вільних йонів водню H^+ в розчині зменшується. Внаслідок цього змінюється кислотність розчину та зростає значення рН. Йони водню H^+ , що утримуються зарядженою наночастиною, притягують до себе карбоксил-йони $RCOO^-$, що призводить до відновлення дисоційованих молекул карбонової кислоти в приповерхневих зонах наночастинок. При цьому кількість йонів H^+ і карбоксил-йонів $RCOO^-$ в розчині зменшується, і при достатньо високій концентрації наночастинок реакція середовища знову наближається до нейтральної [1].

В результаті навколо наночастки формується наноболонка з молекул карбонової кислоти. Карботовані (при застосуванні лимонної кислоти – цитратовані) наночастинки набувають додаткових антиоксидантних властивостей.

Одночасно гідратовані і карботовані наночастинки мають загальну формулу:



У даній формулі Me_n – наночастка-ядро, Me_n^{2n-} – електрично заряджена наночастка-ядро. Молекули H_2O і $RCOOH$ є лігандами. Кількість лігандів H_2O рівна m . Кількість лігандів $RCOOH$ рівна p . Електричний заряд на поверхні наночастки рівний $2n^-$. Величина електричного заряду $2n$ пов'язана з кількістю лігандів m і p наступним співвідношенням: $2n = 2m + p$.

В Україні карботовані наночастинки також виготовляються промисловим способом (ТУ У 24.6-35291116-003:2008).

Отримані таким чином наночастки олова використовували у наших дослідках.

В експериментах доведено, що наночастки здатні регулювати внутріклітинні процеси, такі як взаємодія білок-білок, білок-нуклеїнова кислота та ферментативну активність [6].

Одним із напрямів сучасної координаційної хімії є дизайн та синтез наночастинок. Вони є однією великою молекулою, що містить сотні атомів, мають просторову структуру з порами та порожнинами певних розмірів і форм. Такі частки, подібно до білків, виконують функцію рецепторів і здатні розпізнавати неорганічні та органічні субстрати [7].

Існує думка, що наночастки здатні взаємодіяти із білковими молекулами розміром від 5 до 100 нанометрів (нм) [8]. Цікаві результати були отримані Fischer G.B. та співробітниками, які досліджували взаємодію розроблених ними наночастинок. Вони склалися із металічного ядра багатогранної форми, яке оточене моношаром, що має властивість самозбиратися. Такі наночастинки мають аніонні функції для поверхневого розпізнавання α -хемотрипсину (ChT).

Експериментально доведено, що між негативно зарядженими наночастинами та активним центром ChT, що оточений катіонними залишками, створюється комплексна електростатична взаємодія. Процес згубної дії наночастинок на ChT протікає у два етапи: швидкого зворотного з'єднання та більш повільного та незворотного процесу денатурації. Причиною денатурації білку може слугувати наявність заряджених кластерів наночастинок на поверхні білку та низької діелектричної проникності гідрофобного ядра [8].

Багато повідомлень у джерелах літератури щодо дії наночастинок біоцидних металів (Ag, Cu, Zn) на бактерії та віруси. За допомогою електронної мікроскопії дослідниками було встановлено, що в перші години перебування бактерій у воді, що містить наночастинки біологічно активних металів відбувається їх налипання на поверхню бактерій. Дослідники схилиються до думки, що на-

ночастки та їхні кластери є джерелом іонів металу. Бактерії, поглинаючи іони металу, змінюють хімічну рівновагу у всій водній системі. Для відновлення рівноваги, наночастинки випромінюють із себе іони, і таким чином утворюються направлені іонні потоки, що забезпечують ефективне ураження бактерій [9].

Зміна у русі заряджених часток через мембрану живої клітини призводить до зміни її трансмембранного потенціалу за рахунок накопичення позитивних та негативних зарядів на зовнішній або внутрішній сторонах клітинної мембрани.

Із джерел літератури відомо, що зародки гельмінтів проявляють значну стійкість до дії концентрованих розчинів важких металів, лугів та кислот [10]. Тож, припущення щодо можливості біоцидного впливу іонів металів на яйце нематоди немає необхідності розглядати.

У доступних нам джерелах літератури немає повідомлень щодо вивчення дії наночастинок металів на яйця паразитичних нематод, тим більше обґрунтування механізму їхньої дії. Матеріалом для проведених нами експериментів щодо з'ясування овоцидної дії наночастинок олова був збудник аскарозу свиней.

Ascaris suum відносять до типу Nematoda, підрозділу Ecdysozoa, розділу Triploblastica seu Bilateria, надрозділу Invertebrata, підцарства Metazoa царства Animalia.

Для встановлення механізму овоцидної дії наночастинок олова на яйця гельмінтів необхідно враховувати особливості їхньої будови, циклу розвитку, обміну речовин. Проте, у геогельмінтів, не зважаючи на велику різноманітність у формі, величині та забарвленні яєць, будова оболонок, які захищають зародок, практично однакова [11].

Найбільш складною є оболонка яєць аскарид, яка має п'ять шарів: зовнішній – білкова або епітеліальна; три, так звані, глянцева і внутрішня – ліпоїдна або волокниста оболонка. Зовнішні оболонки, на думку М.М. Завадовського, виконують функцію механічного захисту. Внутрішня оболонка заслуговує особливої уваги. На відміну від інших оболонок вона має здатність вибірково пропускати всередину яйця кисень повітря та затримувати різні хімічні речовини (солі, кислоти, луги), крім тих, що розчиняють ліпіди. Ліпоїдна оболонка розчиняється у спиртах високої концентрації, хлороформі, ефірі, ацетоні, кислотах жирного ряду тощо. Зовнішні шари оболонки яйця здатні пропускати вологу, яка робить їх еластичними, в той час як ліпоїдний шар пропускає воду лише на ранніх стадіях розвитку. В міру розвитку яєць проникність оболонок зменшується [12].

Розвиток яєць аскарид відбувається лише за аеробних умов. На будь-якій стадії розвитку при обмеженні доступу кисню розвиток яйця призупиняється і продовжується лише після його відновлення. Затримка у розвитку яйця може тривати три місяці і більше [10].

У аскарид є специфічні гліколіпіди – аскарозиди А, В, С, які відіграють захисну роль, входячи до складу мембран, характерних для багатьох видів нематод. Ці поверхневі сполуки беруть участь у розпізнаванні окремих факторів довкілля та в реакції клітин на ці фактори.

В біологічних системах генерація енергії завжди пов'язана з окисно-відновними реакціями, тобто передачею заряджених часток. Енергетичний обмін у личинок, що розвиваються в яйцях аскарид здійснюється шляхом чергування процесів гідролізу тригліцеридів та жирних кислот, які згорають у циклах β -окислення і трикарбонових кислот. А після десятого дня розвитку личинки підвищується активність ферментів гліоксального шляху. Причому, перетворення вищих жирних кислот у глікоген має місце у рослин і є вкрай несподіваним для еукаріот [12]. Кожна жива клітина має трансмембранний електричний потенціал, який становить близько 70 мілівольт.

Внутрішня поверхня мембрани заряджена негативно по відношенню до зовнішньої. Трансмембранний потенціал пов'язаний з механізмами функціонування самої клітинної мембрани. Більша частина матеріалу, що транспортується через клітинну мембрану є іонами, які мають позитивний або негативний заряд та масу [13].

Оскільки, поверхнева оболонка зародка нематоди представлена білками, слід зупинитись на їх властивостях.

Важливою властивістю білкових молекул є їх здатність у водних розчинах змінювати свій заряд, який пов'язаний із зміною рН. Білок проявляє амфотерні властивості. Кислотних властивостей білку надають карбоксильні групи аспарагінової та глютамінової амінокислот, а лужних – радикали аргініну, лізину та гістидину. Ці ж групи мають електричний заряд, що формує загальний заряд білкової молекули: для лужних – позитивний, для кислих – негативний. Фактором, що визначає поведінку білка як катіона чи аніона є реакція середовища: в лужному середовищі (рН 7–14) білок віддає протон і заряджається негативно, а в кислій (рН 1–7) проявляється дисоціація кислотних груп і білок стає катіоном [14].

Яйце аскариди має зовнішню білкову оболонку, яка представлена поверхневим білком кутикули яєць. Білок вивчений частково, але відомо, що амінокислотний склад на різних етапах розвитку *Ascaris suum* різниться. Такі амінокислоти білків як аргінін, лізин, гістидин представлені на всіх стадіях їхнього розвитку від яйця до статевозрілої нематоди. Бокові ланцюги цих амінокислот заряджені позитивно, оскільки в них є атом нітрогену [12].

Колоїдний розчин, який ми застосовуємо у експерименті має величину рН 6,7–6,9, тож можемо припустити, що саме цей фактор є визначальним для створення умов прояву кулонівських сил між позитивно зарядженими радикалами білкових молекул кутикули яєць та наночастками олова. Заряд білка набуває позитивних значень, а висококоординаційні аніоноподібні аквахелати наноолова та їх кластери притягуються до зовнішньої поверхні яєць нематод.

В подальшому, припинення метаболічних процесів всередині зародка нематоди веде до втрати білками заряду, внаслідок чого наночастки не здатність утримуватись на поверхні оболонки яєць.

Сам лише факт "налипання" наночасток на поверхню яєць *Ascaris suum* не здатний спричинити загибель зародка.

Відомо, що наночастки олова отримані за допомогою ерозійно-вибухової технології володіють електричним зарядом зі знаком мінус.

Електричне поле створюється електрично зарядженими наночастками металу або наногальванічними елементами. Кількість наночасток в середовищі може досягати 10^{10} – 10^{12} часток/л. Вони беруть участь в броунівському русі рідини і можуть знаходитися в безпосередній близькості від яєць гельмінтів.

При розмірі наночастинок 100 нм напруженість електричного поля в ближній зоні наночастинок сягає 10^5 В/см. Електричне поле такої сили здатне спричинювати електричну деструктуризацію мембрани клітин та зародка вцілому. Адже його напруженість на три порядки перевищує пороговий рівень напруги при методі дезінвазії електричним полем, що і призводить до знищення гельмінтів і їх яєць [15].

У доступній нам літературі відсутня інформація щодо чітко встановленого механізму дії наночасток на об'єкти живої природи. Різні гіпотези та окремі уривчасті повідомлення не дають можливості сформувати єдину універсальну схему взаємодії між наночасткою та живою клітиною, мікроорганізмом і т.д.

Вважають, що наночастки з біологічно сумісною оболонкою, до яких відносять карботовану, здатні проникати всередину клітин та впливати на метаболічні процеси. Олово є антагоністом цинку та міді – мікроелементів, що входять до складу великої кількості клітинних ферментів та пов'язаних із ними обмінних процесів [16]. Можна припустити, що овоцидний ефект наночасток олова, також, пов'язаний із внутрішньоклітинними процесами, пригніченням ферментативних чи метаболічних процесів всередині яєць нематоди.

Висновки. Отже, аналізуючи дослідження фахівців щодо механізму біологічної дії наночасток та порівнюючи їх із власними дослідженнями можемо зробити висновок, що механізм овоцидної дії наноаквахелатів олова є комплексним і здійснюється у два етапи. Перший етап пов'язаний з ефектом "налипання" наночасток на поверхню яєць гельмінта, що пояснюється, на нашу думку, кулонівськими силами, які виникають між негативно зарядженою наночасткою та позитивно зарядженими радикалами білкових молекул. Другий етап пов'язаний з дією електрично заряджених наночасток на зародок нематоди, що призводить до втрати ними життєздатності.

1. Здобутки нанотехнології в лікуванні та профілактиці хвороб тварин (впровадження інноваційних технологій) / [Борисевич В.Б., Борисевич Б.В., Хомин Н.М. та ін.]; за ред. В.Б. Борисевича. – К., 2009. – 185 с. 2. Пат. на корисну модель 23550 Україна, МПК (2006) В 22 F 9/14. Спосіб ерозійно-вибухового диспергування металів. / Каплуненко В.Г., Косинов М.В.; заявл. 25.05.07; опубл. 13.04.08, Бюл. № 7. 3. Волошина Н.О. Особливості впливу наночасток олова на яйця *Ascaris suum* // Наукові записки НАУКМА, 2009 (у друці). 4. Месяц Г.А. Сильноточная вакуумная дуга как коллективный многозонный процесс / Г.А. Месяц, С.А. Баренгольц // Доклады Академии Наук, 2000. – Том 375. – № 4. – С. 47–48. 5. Патент України на корисну модель №35580. Гідратована і карботована наночастинка / Каплуненко В.Г., Косинов М.В.; опубл. 25.09.2008, Бюл. №18. 6. Youa C. The biomacromolecule-nanoparticle interface / C. Youa, A. Chompoosora, V. Rotello // Nano Today, 2007. – Volume 2. – Issue 3. – № 6. – Р. 34–43. 7. Скопенко В.В. Координационная химия : учеб. пособие / В.В. Скопенко, А.Ю. Цивадзе, Л.И. Савранский, А.Д. Гарновский. – М. : ИКЦ "Академкнига", 2007. – 487 с. 8. Химия твердого тела и современные микро- и нанотехнологии: электронные ресурсы: тезисы докладов. VI междунар. науч. конф., 17–22 сент. 2006 г., Кисловодск / А.А. Волков, А.С. Кузмичев // Нанотехнология и нанозлементы, 2006. – Режим доступа к журн.: <http://science.ncstu.ru/conf/past/2006/http://theses/nano>. 9. Рутберг Ф. Г. Импульсные разряды против микробов / Ф.Г. Рутберг, В.А. Коликов, В.Е. Курочкин, Л.К. Панина // Нанотехнология и нанозлементы, 2008. – Режим доступа к журн.: <http://science.ncstu.ru/conf/past/2006/http://theses/nano>. 10. Романенко Н.А. Санитарная паразитология: (Руководство для врачей) / Н.А. Романенко, И.К. Падченко, Н.В. Чебышев. – М.: Медицина, 2000. – 342 с. 11. Мозговой А.А. Аскариды животных и человека и вызываемые ими заболевания / А.А. Мозговой. – М.: Издательство Академии Наук СССР, 1953. – 344 с. 12. Сопрунов Ф.Ф. Молекулярные основы паразитизма / Ф.Ф. Сопрунов. – М.: "Наука", 1987. – 223 с. 13. Тиноко И. Физическая химия. Принципы и применение в биологических науках / И. Тиноко, К. Зауэр, Дж. Вэнг, Дж. Паглиси. – М.: Техносфера, 2000. – 744 с. 14. Кнорре Д.Г. Биологическая химия : Учеб. для хим., биол. и мед. спец. вузов / Д.Г. Кнорре, С.Д. Мызина. – 3-е изд., испр. – М.: Высш. шк. 2002. – 479 с. 15. Патент 2038320 Российская Федерация, МПК 6 С 02 F 1/46, С 02 F 11/00. Способ обеззараживания сточных вод / Гузов И. П., Худиков Н. М.; заявитель и патентообладатель – ВНИИ экспериментальной физики. – № 4921557/26; заявл. 25.03.91; опубл. 27. 06.95, Бюл. № 26. 16. Биологическое действие макро- и микроэлементов: пособие [для студ.] / Н.М. Сторожок. – 2006. – С. 24.

Надійшла до редколегії 17.04.09