



# Генетика, селекція, біотехнологія

УДК 619:616.981.55-615.371

© 2017

*Г.Ф. Риженко,*  
кандидат  
біологічних наук

*О.І. Горбатюк,*  
*В.О. Андріяшук,*

*О.М. Жовнір,*  
*Т.М. Уховська,*

кандидати  
ветеринарних наук

*С.М. Тютюн*  
Інститут ветеринарної  
медицини НААН

*Л.С. Рєзніченко,*

*С.М. Дибкова,*

*Т.Г. Грузіна,*

кандидати  
біологічних наук

Інститут біологічної хімії  
імені Ф. Д. Овчаренка  
НАН України

## **ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ЗАСТОСУВАННЯ КОЛОЇДНИХ РОЗЧИНІВ НАНОЧАСТИНОК МЕТАЛІВ AuNP, AgNP, CuNP І FeNP У БІОТЕХНОЛОГІЇ ВИГОТОВЛЕННЯ ВАКЦИН**

**Мета.** Визначити перспективність і доцільність застосування наночастинок металів у біотехнології виготовлення вакцин, визначити стимулювальні концентрації наночастинок золота, срібла, міді, заліза для вакцинних штамів бактерій. **Методи.** Мікроскопічний, бактеріологічний, біологічний, хімічний, варіаційно-статистичний. **Результати.** Обґрунтовано доцільність застосування колоїдних розчинів наночастинок металів (золота, срібла, міді, заліза), синтезованих методом хімічної конденсації, як перспективних для біотехнології виготовлення вакцин. Біобезпечність вибраних AuNP, AgNP, CuNP, FeNP підтверджено негативними тестами на цито- і генотоксичність та мутагенність. Визначено їхні індивідуальні концентрації, які активізують метаболічні процеси у клітинах вакцинних штамів збудників і сприяють збільшенню об'ємів бактеріальної маси під час виготовлення вакцин. **Висновки.** Доцільно застосовувати, синтезовані методом хімічної конденсації, колоїдні розчини AuNP, AgNP, CuNP, FeNP у біотехнології виготовлення вакцин як стимуляторів росту клітин вакцинних штамів мікроорганізмів.

**Ключові слова:** наночастинок металів, біобезпека, цитотоксичність, генотоксичність, мутагенність, H<sup>+</sup>-АТФ-азна активність, бактеріальна маса, вакцина.

Нині невід'ємним складником науково-технічного прогресу у світі є визначальна роль наноматеріалів, які синтезують

різними методами і застосовують у наномедицині, нанофармакології, нанотоксикології та нанофармації [1, 2].

Якісно новий рівень протидії інфекційним захворюванням може бути забезпечено завдяки застосуванню новітніх нанобіотехнологій і наноматеріалів. Стабільність властивостей наночастинок металів залежить від способу їх одержання, які умовно розділяють на групи — хімічний синтез, механосинтез та абляційні нанотехнології [3–6].

Визначення особливостей модуляції наночастинок металів біохімічних процесів у біосистемах різного рівня організації, зокрема, і клітинах патогенних мікроорганізмів, відкриває нові перспективи їхнього застосування у біотехнології виготовлення специфічних профілактичних засобів [7, 8].

Науковцями отримано дані, які свідчать про можливість контролю та регулювання інтенсивності фізіолого-біохімічних реакцій у клітинах бактерій [9].

Установлено, що біогенні наночастинок металів є кофакторами переважної більшості біохімічних процесів у живих системах, тому їх стимулювальна активність є результатом комплексного біофізично-біохімічного ефекту [10, 11].

Нові тенденції наукового прогресу щодо застосування наночастинок металів у медицині, зокрема ветеринарній, є актуальними для вирішення потреб людини, проте мають певні ризики. У країнах ЄС застосування наявних і новостворюваних нанопрепаратів суворо регламентується на законодавчому рівні.

В Україні нині не існує єдиної стандартизованої системи методів визначення безпеки засобів, створених із застосуванням нанотехнологій, проте у галузі ветеринарної медицини вже затверджені та прийняті до впровадження у практику методичні рекомендації, спрямовані на оцінку безпеки наночастинок металів для ветеринарного призначення, які є компонентами імунобіологічних препаратів [12–15].

**Мета досліджень** — визначити перспективні наночастинок металів, експериментально обґрунтувати доцільність застосування їх колоїдних розчинів, синтезованих методом хімічної конденсації, у біотехнології виготовлення вакцин; вивчити характер впливу AuNP і AgNP на величину H<sup>+</sup>-АТФ-азної активності мембранних фракцій

клітин вакцинних штамів мікроорганізмів; визначити оптимальні індивідуальні концентрації AuNP, AgNP, CuNP, FeNP для стимуляції метаболічних процесів у клітинах *S. perfringens* тип А для збільшення об'ємів бактеріальної маси за короткі терміни культивування.

**Матеріали і методи.** Роботу виконано у лабораторії анаеробних інфекцій імені В. Риженка Інституту ветеринарної медицини НААН. Наночастинок металів синтезовано в Інституті біологічної хімії імені Ф.Д. Овчаренка НАН України у вигляді колоїдних розчинів з вихідними концентраціями за металом: AuNP — 38,6 мкг/мл, розмірністю 30 нм; AgNP — 80 мкг/мл, розмірністю 30 нм; CuNP — 32 мг/мл, розмірністю 20 нм; FeNP — 5 мг/мл, розмірністю 40 нм.

Дослідження з оцінки потенційної небезпеки наночастинок металів AuNP, AgNP, CuNP, FeNP проведено за допомогою системних біомаркерів — цитотоксичності, генотоксичності, мутагенності. Цитотоксичність дослідних нанопрепаратів визначали методом оцінки життєздатності клітин за тестом з нейтральним червоним та у МТТ-тесті; генотоксичність — методом ДНК-комет у лужних умовах; мутагенність — анафазним методом підрахунку хромосомних аберацій у клітинах апікальної меристеми цибулі *Allium cepa* («*Allium test*») [12].

Вивчення характеру впливу різних концентрацій AuNP і AgNP на величину H<sup>+</sup>-АТФ-азної активності мембранних фракцій бактерій *E. coli* штам «Рассвет-165» (негемолітичний); *E. coli* штам «Запорізька-12» (гемолітичний); *P. multocida* штам «Полонський»; *L. monocitogenes* штам «Агрофорт»; *S. choleraesuis* штам «Запорізький-32», *S. perfringens* тип А штам «Запорізький 96/130»; *S. perfringens* тип В штам «Полонський-131»; *S. perfringens* тип С штам «Славутський 97/132»; *S. perfringens* тип Д штам «Хмельницький»; *S. septicum* штам «Черкаський-97»; *S. oedematiens* штам «Запорізький-96»; *F. necrophorum* штам «Світанок» проводили за рівнем накопиченого неорганічного фосфору у середовищі інкубації за методом Фіске-Суббароу в умовних одиницях [12].

Для постановки досліду використовували таку методику: із матричних колоїдних

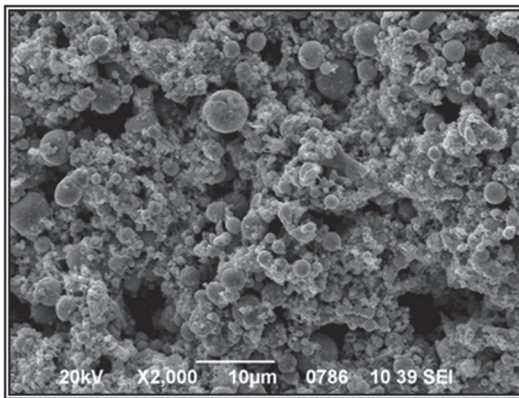
розчинів AuNP, AgNP, CuNP, FeNP виготовляли по 3 робочих розведення у флаконах № 1, 2 і 3 з 40 см<sup>3</sup> МППБ з додаванням стерильного розчину глюкози 10% і стерильної сироватки крові великої рогатої худоби 5% *ex tempore* в асептичних умовах. У флакон № 1 вносили по 10 см<sup>3</sup>; № 2 — по 5; № 3 — по 1 см<sup>3</sup> кожного із дослідних розчинів наночастинок металів вихідних концентрацій. Дослідний штам *S. perfringens* тип А, культивували на середовищі Кітта-Тарроці упродовж 24 год. Суспензію бактеріальних клітин збудника відбирали у стерильні флакони в асептичних умовах, ретельно перемішували, маркували та використовували для посівів у флакони з різними наночастинами металів за їхніх робочих концентрацій. Кожну робочу концентрацію відповідних наночастинок металів розливали у 4 флакони об'ємом по 10 см<sup>3</sup>. Контролем були флакони, куди розливали по 10 см<sup>3</sup> МППБ з глюкозою і сироваткою крові без нанопрепаратів. В усі дослідні і контрольні флакони додавали суспензію добової культури *S. perfringens* тип А; на поверхню засіяного середовища наливали стерильну вазелінову олію для забезпечення умов культивування, максимально наближених до анаеробних. Після інактивації бактеріальної суспензії проводили облік кількісного вмісту бактеріальних клітин у 1 см<sup>3</sup> за оптичним стандартом каламутності [16]. Використано такі методи досліджень: мікроскопічний,

бактеріологічний, біологічний, хімічний, варіаційно-статистичний.

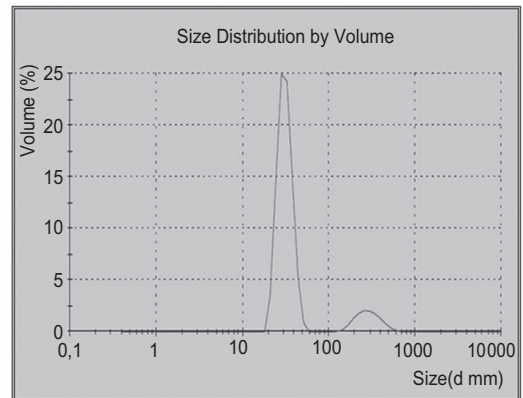
**Результати досліджень.** Оскільки вплив нанорозмірних металів на живий організм вивчено недостатньо, це дає підстави оцінювати потенційні ризики для здоров'я людини, тварини та стану довкілля. Науковцями лабораторії проведені експериментальні дослідження, пов'язані з вибором наночастинок металів залежно від способу їхнього одержання. Попередньо досліджено наноаквахелати аргентуму, феруму, купруму, цинкуму, одержані за допомогою ерозійно-вибухової технології (рис. 1).

Після перевірки зазначених вище нанопрепаратів на атомно-адсорбційному спектрофотометрі встановлено, що їхня концентрація за вмістом металу не відповідала концентраціям, заявленим виробником. Крім того, за результатами електронної мікроскопії, згадані вище нанопрепарати містили у своєму складі наночастинки металів різної розмірності — дрібні, середні і великі.

Під час проведення експериментальних досліджень враховували визначену фактичну концентрацію препарату за металом. Результати пробних досліджень свідчать, що всі згадані вище нанопрепарати за певних концентрацій активізували культуральний ріст штамів патогенних мікроорганізмів за різних термінів їхнього культивування у термостаті [17]. Однак



а



б

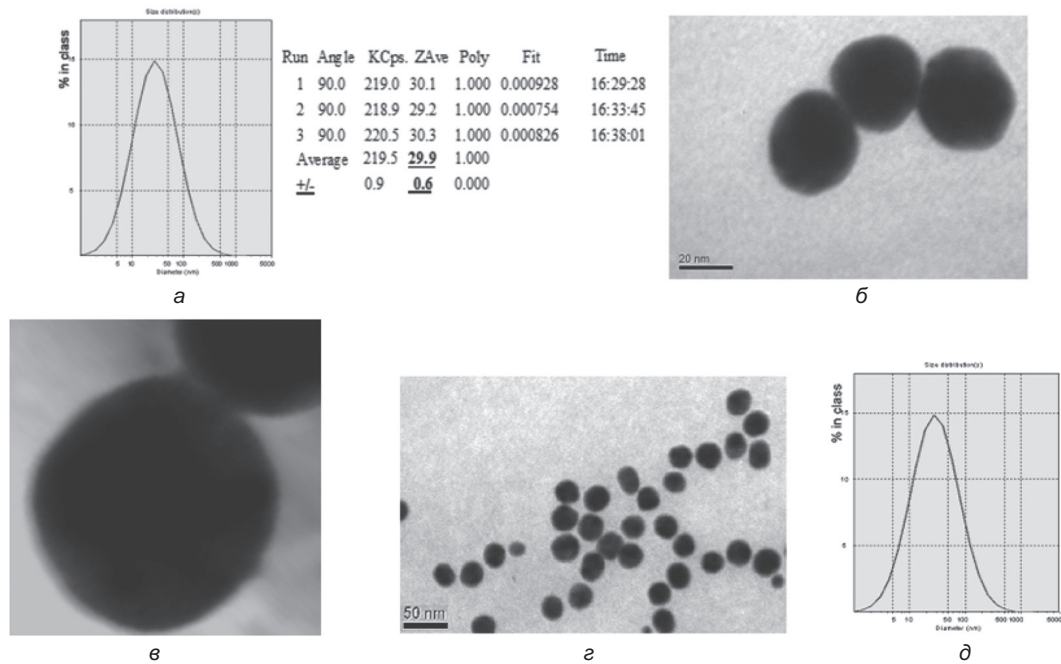
**Рис. 1.** Характеристика наночастинок срібла, одержаних ерозійно-вибуховим способом: а — за формою і розміром; б — показники лазерно-кореляційної спектроскопії

**Характеристика біобезпечності наночастинок металів срібла і золота**

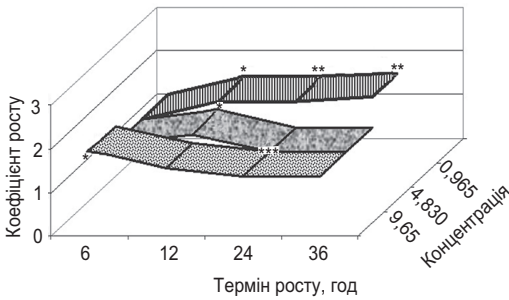
Критерії безпеки	Метод оцінки безпеки	Наночастинок AgNP	Наночастинок AuNP
Цитотоксичність	Забарвлення кристалічним фіолетовим	Безпечні	Безпечні
	МТТ-тест	»	»
Генотоксичність	Кометний аналіз	»	»
Мутагенність	Allium-тест	»	»

визначити стабільні концентрації нанопрепаратів, які викликали б активніший культуральний ріст, не вдалося, оскільки за кожним посівом культур за наявності нанопрепаратів одержано різні показники їхніх концентрацій, здатні активізувати метаболічні процеси у бактеріальних клітинах. Імовірно, така нестабільність результатів пов'язана з різноманітністю вихідних концентрацій нанопрепаратів за металом після їх одержання ерозійно-вибуховим способом та щоразу різними пропорціями наночастинок металів дрібних, середніх і великих розмірностей.

Пошук наночастинок металів, перспективних для використання у біотехнології виготовлення вакцин, продовжували, і надалі науковцями лабораторії експериментально обґрунтовано доцільність застосування колоїдних розчинів наночастинок металів (золота, срібла, міді і заліза), синтезованих методом хімічної конденсації у водному розчині згідно з оригінальними протоколами, розробленими в Інституті біологічної хімії імені Ф.Д. Овчаренка НАН України. Хімічний синтез забезпечував одержання наночастинок однакової розмірності, концентрації за металом, що



**Рис. 2. Характеристика наночастинок металів за формою і розміром: а — показники лазерно-кореляційної спектроскопії AuNP; б — електронно-мікроскопічне зображення AuNP; в — електронно-мікроскопічне зображення FeNP; г — електронно-мікроскопічне зображення AgNP; д — показники лазерно-кореляційної спектроскопії AgNP**



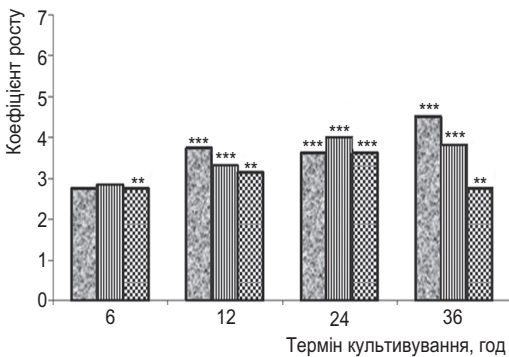
**Рис. 3.** Динаміка показників росту бактеріальних клітин *C. perfringens* тип А за різних термінів культивування за наявності різних концентрацій AuNP; \*  $P > 0,05$ ; \*\*  $P > 0,01$ ; \*\*\*  $P > 0,001$  порівняно із початковими даними (до рис. 3–6)

впливало на стабільність показників і підтверджено результатами трансмісійної електронної мікроскопії (рис. 2).

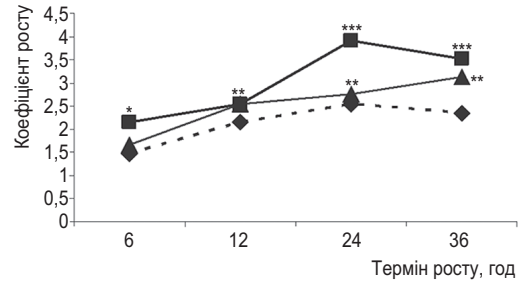
Попередження біоризиків для здоров'я тварин, людини і безпеки довкілля залишається першочерговим завданням за виготовлення засобів специфічної профілактики.

Науковцями лабораторії спільно із співробітниками Інституту біологічної хімії імені Ф.Д. Овчаренка НАН України проведено дослідження та підтверджено біобезпечність синтезованих колоїдних розчинів AuNP, AgNP, CuNP і FeNP, перспективних для біотехнології виготовлення вакцин, за негативними тестами на цитотоксичність, генотоксичність і мутагенність (таблиця).

Попередні пошукові дослідження науковців

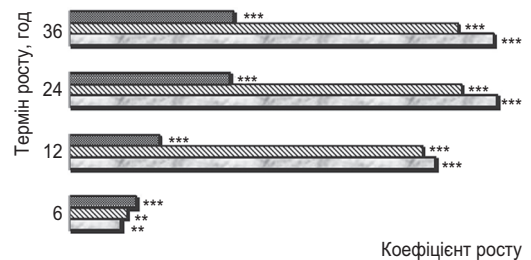


**Рис. 4.** Вплив різних концентрацій наночастинок AgNP на ріст бактеріальної маси *C. perfringens* тип А: ■ — 20 мкг/мл; ▨ — 10; ▩ — 2 мкг/мл



**Рис. 5.** Показники коефіцієнта росту *C. perfringens* тип А за різних термінів культивування за наявності CuNP різної концентрації: ▲ — 0,080 мг/мл; ■ — 0,040; -◆- - 0,008 мг/мл

лабораторії з вивчення можливостей застосування синтезованих колоїдних розчинів наночастинок металів (золота, срібла, міді і заліза) у біотехнології виготовлення ветеринарних імунобіологічних засобів для активізації процесів росту виробничих штамів збудників свідчать про перспективність їхнього використання. За аналізом результатів досліджень з вивчення характеру впливу різних концентрацій AuNP і AgNP на величину  $H^+$ -АТФ-азної активності мембранних фракцій бактерій аеробних і анаеробних збудників *E. coli* усіх досліджуваних штамів було встановлено, що для аеробних мікроорганізмів більші стимулювальні властивості виявлено за впливу наночастинок золота, для анаеробних — наночастинок срібла. Характер відгуку величин питомої  $H^+$ -АТФ-азної активності мембранних фракцій аеробних і анаеробних збудників має виражену видову та штамову специфічність,



**Рис. 6.** Ріст культури *C. perfringens* тип А за наявності різних концентрацій наночастинок FeNP і термінів культивування: ▨ — 0,060 мг/мл; ▩ — 0,310; ■ — 0,625 мг/мл

тому потребує індивідуального підбору концентрацій наночастинок металів для кожного виробничого штаму мікроорганізмів, які використовують у біотехнології виготовлення вакцин.

Зважаючи на результати експериментів з вивчення впливу різних концентрацій AuNP і AgNP на величину  $H^+$ -АТФ-азної активності мембранних фракцій вакцинних штамів мікроорганізмів, нами проведено дослідження з визначення найменших індивідуальних стимулювальних концентрацій наночастинок золота (AuNP), срібла (AgNP), міді (CuNP), заліза (FeNP), які активізували метаболічні процеси у клітинах *S. perfringens* тип А і сприяли накопиченню найбільших об'ємів бактеріальної маси, та визначено оптимальні терміни їхнього культивування. Результати досліджень з вивчення впливу AuNP на метаболічні процеси бактеріальних клітин *S. perfringens* тип А свідчать, що культивування культури за наявності нанопрепарату за концентрації 0,965 мкг/мл упродовж 36 год забезпечувало динамічне вірогідне зростання бактеріальної маси за коефіцієнтом росту у 2,06 рази ( $P > 0,01$ ) порівняно з початковими показниками (рис. 3).

Аналіз результатів досліджень щодо впливу наночастинок срібла на стимуляцію метаболічних процесів *S. perfringens* тип А

свідчить, що ріст бактерій за наявності 20 мкг/мл AgNP упродовж 24 год сприяв збільшенню об'ємів бактеріальної маси за коефіцієнтом росту у 4,02 рази ( $P > 0,001$ ) порівняно з початковими даними (рис. 4).

Експериментальні дослідження з вивчення впливу наночастинок міді на стимуляцію росту *S. perfringens* тип А свідчать, що за культивування культури збудника за наявності 0,040 мг/мл наночастинок міді упродовж 24 год спостерігалось зростання об'єму бактеріальної маси за коефіцієнтом росту майже у 4 рази ( $P > 0,001$ ) порівняно із даними на початку експерименту (рис. 5).

Оптимальною індивідуальною концентрацією нанопрепарату заліза визначено 0,310 мг/мл, оскільки за такого його вмісту об'єм бактеріальної маси *S. perfringens* тип А упродовж 24 год культивування вірогідно зростав у 23,5 рази ( $P > 0,001$ ) порівняно із початковими даними (рис. 6).

Одержані результати досліджень сприяють удосконаленню технологічних процесів у біотехнології виробництва вакцинних препаратів, а вакцини, які містять наночастинки металів, імовірно, можуть позитивно впливати на метаболічні процеси в організмі тварин, оскільки містять активні біотичні мікроелементи — наночастинки золота, срібла, міді і заліза.

## Висновки

Експериментально обґрунтовано доцільність застосування колоїдних розчинів наночастинок металів срібла, золота, міді і заліза, синтезованих методом хімічної конденсації у водному розчині, у біотехнології виготовлення специфічних профілактичних засобів. Підтверджено їхню біобезпечність за негативними тестами на цитотоксичність, генотоксичність і мутагенність. Установлено, що характер відгуку величин питомої  $H^+$ -АТФ-азної активності мембранних фракцій аеробних і анаеробних збудників має виражену видову та штамову специфічність і потребує індивідуального підбору концентрацій наночастинок металів для кожного виробничого

штаму мікроорганізмів, які використовують у біотехнології виготовлення вакцин. Для стимуляції метаболічних процесів культури *S. perfringens* тип А і одержання значних об'ємів бактеріальної маси за короткі терміни культивування оптимальні індивідуальні концентрації нанопрепаратів мають становити: AuNP — 0,965 мкг/мл; AgNP — 10 мкг/мл; CuNP — 0,040 мг/мл; FeNP — 0,625 мг/мл.

Перспективи подальших пошуків стосуються вивчення особливостей проникнення, накопичення наночастинок металів у паренхіматозних органах тварин і термінів їхньої елімінації, що є надважливою проблемою за використання нанотехнологій.