

І. С. ЧЕКМАН, З. Р. УЛЬБЕРГ, В. О. МАЛАНЧУК,
Н. О. ГОРЧАКОВА, І. А. ЗУПАНЕЦЬ

НАНО

НАУКА
БІОЛОГІЯ
ФАРМАЦІЯ

КИЇВ • 2012

УДК 615+571-022.532
ББК 52.82.+28
Н25

Чекман І. С., член-кор. НАН та НАМН України;
Ульберг З. Р., професор; Маланчук В. О., член-кор. НАМН України;
Горчакова Н. О., професор; Зупанець І. А., професор;
Шаторна В. Ф., професор; Вілоус С. Б., к.ф.н.; Грузіна Т. Г., к.б.н.;
Дибкова С. М., к.б.н.; Нагорна О. О., к.м.н.; Небесна Т. Ю., к.ф.н.;
Полова Ж. М., к.ф.н.; Резніченко Л. С., к.б.н.; Савенкова О. О., к.м.н.;
Дорошенко А. М., аспірант; Прискока А. О., аспірант; Рибачук А. В., аспірант; Савченко
Д. С., аспірант; Сімонов П. В., аспірант; Нагорна Т. І.

Рецензенти:

Уваров В. М., член-кореспондент НАН України, доктор фізико-математичних наук, професор, завідувач відділу Інституту металофізики ім. Г. В. Курдюмова;

Туманов В. А., доктор медичних наук, професор, завідувач кафедри фармакології Київського медичного університету асоціації народної медицини України

І. С. Чекман, З. Р. Ульберг, В. О. Маланчук,
Н. О. Горчакова, І. А. Зупанець

**Нанонаука, нанобіологія, нанофармація. Монографія / І. С. Чекман,
З. Р. Ульберг, В. О. Маланчук, Н. О. Горчакова, І. А. Зупанець. – К.:
Поліграф плюс, 2012. – 328 с.: іл.**

ISBN 978-966-8977-29-9.

У монографії узагальнені новітні дані літератури та дослідження авторів, що виконані співробітниками кафедри фармакології та клінічної фармакології і кафедри хірургічної стоматології та щелепно-лицевої хірургії Національного медичного університету ім. О.О. Богомольця, лабораторією електронно-променевої нанотехнології неорганічних матеріалів для медицини Інституту електрозварювання ім. Є.О. Патона і Національного медичного університету ім. О.О. Богомольця, Інституту біоколоїдної хімії ім. Ф.Д. Овчаренка НАН України, Національного фармацевтичного університету, Львівського Національного медичного університету імені Данила Галицького стосовно проблем нанонауки, нанобіології, нанофармації.

УДК 615+571-022.532
ББК 52.82.+28

ISBN 978-966-8977-29-9

© І. С. Чекман, З. Р. Ульберг,
В. О. Маланчук, Н. О. Горчакова,
І. А. Зупанець, 2012
© ТОВ «Поліграф плюс», 2012

ЗМІСТ

ВСТУП (І.С. Чекман)	6
РОЗДІЛ 1. НАНОНАУКА: ІСТОРІЯ СТАНОВЛЕННЯ, СТАН, ПЕРСПЕКТИВИ ДОСЛІДЖЕНЬ (І.С. Чекман, З.Р. Ульберг)	8
РОЗДІЛ 2. НАНОТЕХНОЛОГІЇ І НАНОМАТЕРІАЛИ	27
2.1. Біоетичні аспекти нанотехнологій, наномедицини (І.С. Чекман, І.А. Зупанець, В.Ф. Шаторна)	27
2.2. Класифікація і властивості наноматеріалів (Н.О. Горчакова, І.А. Зупанець, О.О. Нагорна, П.В. Сімонов)	34
2.3. Наномедицина: медико-соціальний аспект (Н.О. Горчакова, І.С. Чекман, О.О. Нагорна)	45
2.4. Методичні основи дослідження наноматеріалів (В.О. Маланчук, А.В. Рибачук)	59
2.5. Наноструктуроване срібло (І.А. Зупанець, А.О. Прискока, Л.С. Рєзніченко)	74
2.6. Методи синтезу, клініко-фармакологічні та токсикологічні властивості наноміди (Н.О. Горчакова, О.О. Нагорна, П.В. Сімонов)	91
2.7. Фармакологічні, біологічні, екологічні та клінічні аспекти застосування нанозаліза (А.М. Дорошенко, В.Ф. Шаторна, О.О. Савенкова)	108
2.8. Фізико-хімічні та біологічні властивості наномангнію (Н.О. Горчакова, Т.І. Нагорна)	131
2.9. Застосування сполук нанозинку та наноалюмінію у медицині (Т.Ю. Небесна, О.О. Савенкова)	139
2.10. Вуглецеві наноеентеросорбенти (Д.С. Савченко)	149
РОЗДІЛ 3. НАНОБІОЛОГІЯ	160
3.1. Нанобіологія, біоміметика та природні наноструктури (І.С. Чекман, П.В. Сімонов, О.О. Нагорна, В.Ф. Шаторна)	160
3.2. Біомембрана: наноструктура та вплив наночастинок (П.В. Сімонов)	174
3.3. Біологічні системи різного рівня організації і наночастинок золота (З.Р. Ульберг, Т.Г. Грузіна, Л.С. Рєзніченко, С.М. Дибкова)	190

РОЗДІЛ 4. НАНОФАРМАЦІЯ	228
4.1. Фармацевтичні основи розробки нанопрепаратів (С.Б. Білоус)	228
4.2. Фармацевтичні та фармакологічні властивості наночастинок (І.С. Чекман, І.А. Зупанець, Т.Ю. Небесна, А.О. Прискока)	239
4.3. Допоміжні речовини у розробці нанопрепаратів: фармакологічні, фармацевтичні та технологічні аспекти (Д.С. Савченко)	258
4.4. Наночастинки у лікарських формах: основи фармацевтичної технології (Ж.М. Полова)	266
РОЗДІЛ 5. КЛІНІЧНІ АСПЕКТИ ЗАСТОСУВАННЯ НАНОТЕХНОЛОГІЙ В ХІРУРГІЧНІЙ СТОМАТОЛОГІЇ ТА ЩЕЛЕПНО-ЛИЦЕВІЙ ХІРУРГІЇ (В.О. Маланчук, А.В. Рибачук)	281
5.1. Хірургічна стоматологія, черепно-щелепно-лицева пластична та естетична хірургія, травматологія та дентальна імплантація (В.О. Маланчук, А.В. Рибачук)	284
5.2. Застосування наночастинок кремнію в хірургічній стоматології та щелепно-лицевій хірургії (В.О. Маланчук, А.В. Рибачук)	313
5.3. Перспективи діагностики та лікування онкологічних захворювань голови та шиї (В.О. Маланчук, А.В. Рибачук)	320
УЗАГАЛЬНЕННЯ (І.С. Чекман, З.Р. Ульберг)	326

3.3. БІОЛОГІЧНІ СИСТЕМИ РІЗНОГО РІВНЯ ОРГАНІЗАЦІЇ І НАНОЧАСТИНКИ ЗОЛОТА

УЛЬБЕРГ З.Р., ГРУЗИНА Т.Г.,
РЕЗНІЧЕНКО Л.С., ДИБКОВА С.М.

Унікальні фізико-хімічні, біологічні, біохімічні, фармакологічні властивості, такі як інертність, стабільність, біосумісність, вплив на органи організму, низький рівень цитотоксичності та інше, обумовлюють значний інтерес фахівців різних спеціальностей до металів нанорозмірів, у тому числі наночастинок золота і визначають перспективність широкого їх застосування: у якості векторів для цільової доставки протипухлинних, протизапальних та протимікробних засобів, для створення біосенсорів, а також у якості контрастних агентів, ефективніших за стандартні препарати на основі йод-похідних сполук [36, 43, 45, 48, 53, 54, 64, 66].

Методи отримання та характеристика наночастинок золота різного розміру. Усі відомі на сьогоднішній день методи синтезу наночастинок золота можна умовно поділити на дві групи: дисперсійні та конденсаційні [11]. Дисперсійні методи засновані на руйнуванні кристалічної решітки металевого золота під дією електричного струму високої напруги. Під впливом електричного струму в рідині між двома золотими електродами утворюється електрична дуга. Під час її «горіння» відбувається перенесення речовини між електродами, яке супроводжується утворенням наночастинок золота. На вихід та форму частинок, що утворюються під дією електричного струму, окрім напруги між електродами та сили струму, впливає також наявність у розчині електролітів. При використанні постійного струму утворюються неоднорідні за розміром частинки золота. Додавання навіть незначних кількостей лугів або хлоридів і застосування для розпилення змінного струму високої частоти суттєво покращують якість наночастинок золота, однак, розподіл частинок за розміром частіш за все залишається достатньо широким [11, 30].

Більш поширеними, порівняно з дисперсійними, є конденсаційні методи. Їх розділяють на фізичні та хімічні. Формування наночастинок цими методами здійснюється через низку проміжних станів, які призводять до виникнення зародків нової фази, спонтанного їх росту та утворення фізичної поверхні розділу фаз. При цьому важливим є контроль швидкостей утворення зародків нової фази та їх росту [11, 30, 71].

Найбільш часто за допомогою конденсаційних методів наночастинки золота отримують відновленням галогенідів золота (наприклад, HAuCl_4) із використанням хімічних відновлювачів, ультразвукового, ультрафіолетового опромінення, імпульсного або лазерного радіолізу [11, 30, 83]. У якості хімічних відновлювачів використовують алюмо- та борогідриди, тетраборати, цитрат натрію, формальдегід, ацетон, етиловий спирт, пероксид водню та інші органічні і неорганічні сполуки [11, 44, 67, 70, 82, 83].

Методи хімічної конденсації дозволяють отримувати достатньо стійкі до агрегації наночастинки золота. Так, золь золота червоного кольору із розміром частинок 20 нм, отриманий у 1857 році М.Фарадеєм, зберігся до теперішнього часу. Стійкість до агрегації наночастинок золота пояснюється утворенням подвійного

електричного шару на поверхні тверде тіло – розчин та виникненням електро-статичної складової розклинюючого тиску, що є основним фактором стабілізації цієї системи [11, 30]. Використання одного з зазначених методів дозволяє отримати відповідний тип наночастинок золота із заданими фізико-хімічними характеристиками.

Серед усього різноманіття методів синтезу сферичних наночастинок золота методи хімічної конденсації є найбільш доцільними в умовах забезпечення потреб біології та медицини. Це обумовлено, перш за все, середовищем перебігу реакції синтезу, яким є водний розчин. Можливість отримання водних дисперсій наночастинок золота забезпечує більш виражену спорідненість синтезованих наноматеріалів до біологічних клітин.

На рис. 1 наведені приклади водних дисперсій наночастинок золота різного розміру, синтезованих з використанням конденсаційного методу [22].



Рис. 1. Водні дисперсії препаратів наночастинок золота середніх розмірів 10 нм, 20 нм, 30 нм та 45 нм (зліва направо відповідно), синтезовані конденсаційним методом.

На рисунку 2 наведено електронно-мікроскопічне зображення наночастинок золота середнього розміру 10 нм (водна дисперсія препарату цих наночастинок представлена на рис. 1).

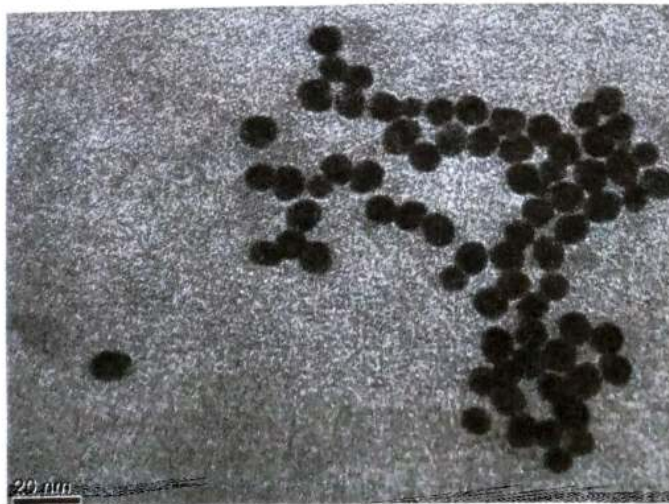
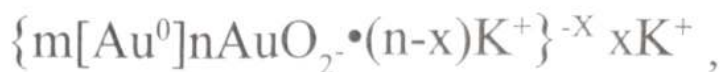


Рис. 2. Електронно-мікроскопічне зображення наночастинок золота розміром ~10 нм.

Метод трансмісійної електронної мікроскопії (ТЕМ), використаний для отримання електронно-мікроскопічних зображень наночастинок золота, входить у перелік обов'язкових методів, рекомендованих для оцінки фізико-хімічних властивостей наноматеріалів за міжнародними стандартами [55].

Методи хімічної конденсації базуються на переході розчиненого золота (водний розчин золотохлористоводневої кислоти) в нерозчинний стан з подальшою агрегацією та кристалізацією нерозчинних частинок, які утворюють дисперсну фазу. Зазвичай, структура наночастинок є досить складною і залежить від умов синтезу та природи використаного стабілізатора [40].

Так, будова наночастинок золота, препарати яких наведені на рис. 1 та рис. 2, може бути представлена формулою:



де m – кількість молекул Au^0 ; n – кількість надлишкових іонів AuO_2^- , що міцно абсорбовані на поверхні агрегату (як правило $m > n$), які є потенціалотворюючими; x – кількість іонів що входять у дифузійний шар; $(n-x)$ – кількість протиіонів K^+ абсорбованого шару. Кількість іонів калію $(n-x)$ – менше кількості абсорбованих іонів AuO_2^- (n), внаслідок чого наночастинка має негативний заряд $(-x)$.

Іони AuO_2^- міцно абсорбуються на поверхні агрегату (Au^0), що визначається правилом Панета і Фаянса, згідно якого на поверхні твердої фази розчину передусім абсорбуються іони, що здатні добудовувати кристалічну решітку наночастинок або ті, що утворюють з іонами кристалічної решітки важкорозчинні сполуки [2].

Іони AuO_2^- , що міцно абсорбовані на поверхні наночастинок, є потенціалотворюючими та обумовлюють їх негативний заряд, який у фізіологічних умовах складає декілька десятків мілівольт [19, 33].

Особливості будови наночастинок золота відіграють значну роль в умовах їх контакту з біологічними системами різного рівня організації. Так, золото, як метал, зазвичай інертне, але наночастинки золота володіють високою реакційною здатністю та можуть слугувати каталізатором для багатьох біохімічних реакцій [36]. Це обумовлено тим, що залежно від розміру наночастинок різна кількість їх атомів-складових знаходиться на поверхні: чим менший розмір частинок тим більший відсоток поверхневих атомів. Внаслідок збільшення площі активної поверхні на одиницю маси, зміни міжатомарної відстані та періоду кристалічної решітки змінюється здатність наночастинок проникати в клітину, їх біологічна активність, а також хімічні, фізичні, фізико-хімічні, та фармакологічні властивості [20, 36].

Характеристика стабільності препаратів наночастинок золота. Важливою характеристикою наноматеріалів, призначених для медико-біологічного застосування, є їх стабільність при контакті з біологічним середовищем. Основним параметром стабільності наночастинок при контакті з біологічними системами різного рівня організації є їх стійкість до коагуляції. Як моделі можуть використовуватись фізіологічний розчин та комерційні препарати плазмозамінників, застосування яких поширене в медичній практиці і може вважатися моделлю крові.

Відомо, що наночастинки золота здатні інтенсивно поглинати світло у видимій області спектру з максимумом поглинання в діапазоні 520 – 550 нм. При цьому положення, форма та інтенсивність піку абсорбції знаходяться у прямій

залежності від розміру та концентрації наночастинок. Ці властивості наночастинок золота дозволяють з високою точністю оцінювати їх стабільність в умовах моделювання контакту з біологічним оточенням [15].

Рівень коагуляції наночастинок золота визначається за зміною положення, інтенсивності та форми піку абсорбції у області спектру 500-560 нм. Так, на рис. 3, на прикладі водної дисперсії наночастинок золота розміром 30 нм, наведені типові дані, які характеризують стабільність препаратів наночастинок у присутності модельних систем крові. Кінцева концентрація модельних систем крові, в якості яких були використані фізіологічний розчин (0,9% NaCl), комерційний плазмозамінник «Стабізол» та комерційний плазмозамінник «Реополіглюкін», при інкубації з наночастинками золота розміром 30 нм становила 10% (рис. 3, А), 20% (рис. 3, Б) та 30% (рис. 3, В).

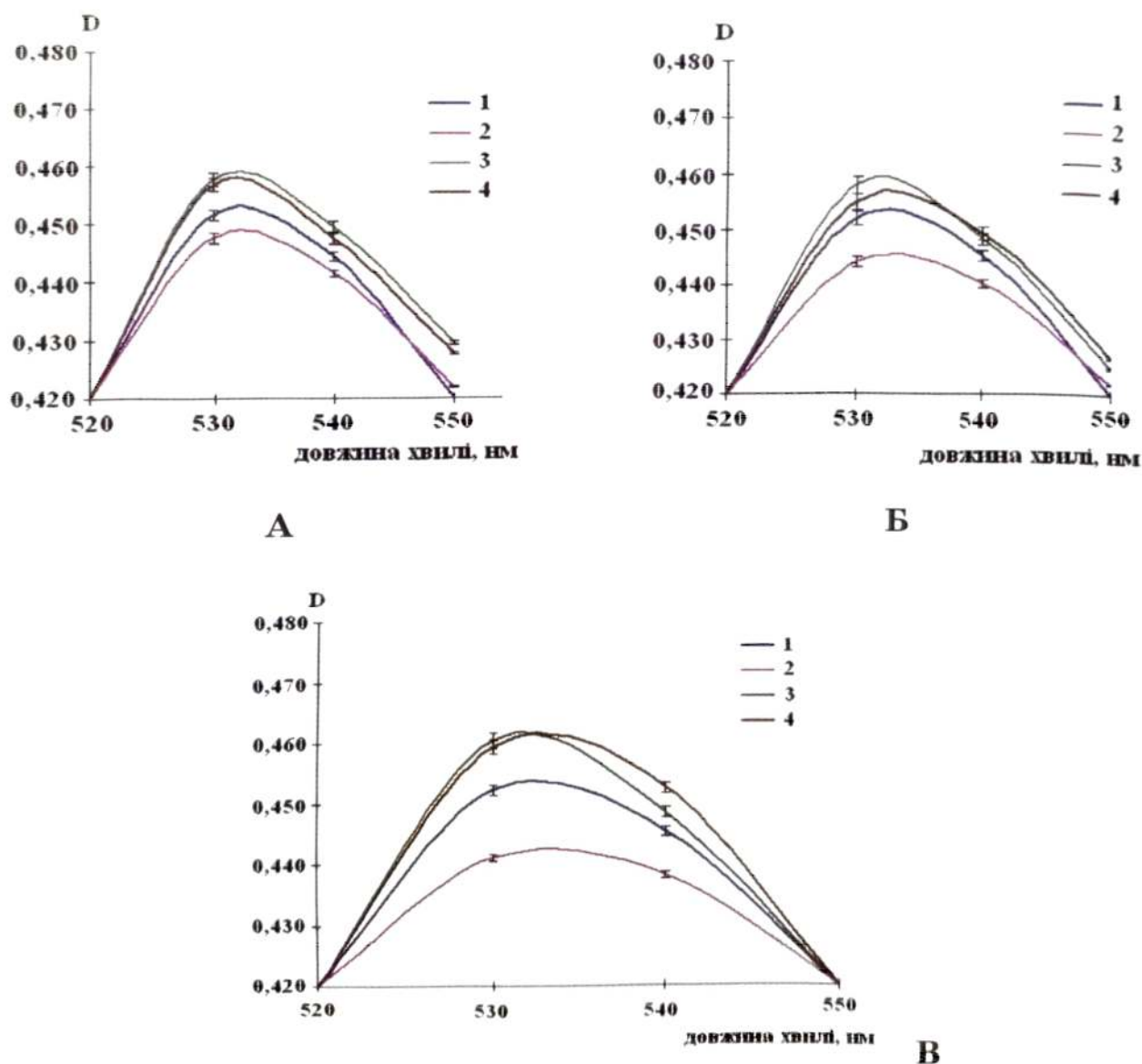


Рис. 3. Стабільність наночастинок золота (НЗ) розміром 30 нм після 30 хв інкубації в модельних системах крові, кінцева концентрація яких складає 10% (А), 20% (Б) та 30% (В): крива 1 – контроль, НЗ : вода = 1:1 (по об'єму); крива 2 – НЗ : фізіологічний розчин = 1:1; крива 3 – НЗ : плазмозамінник «Стабізол» = 1:1; крива 4 – НЗ : плазмозамінник «Реополіглюкін» = 1:1 ($M \pm m$; $n=5$; $P < 0,05$).

Дані, наведені на рис. 3 свідчать, що присутність у контактній суміші 10% розчину модельних систем не впливає на стабільність препаратів наночастинок золота: положення, форма та інтенсивність піків абсорбції кривих 2-4 достовірно не відрізняються від контрольного значення (рис. 3, А, крива 1).

У присутності 20% та 30% фізіологічного розчину спостерігаються незначні зміни положення піків абсорбції (рис. 3 Б, крива 2 та рис. 3 В, крива 2), порівняно з контролем (крива 1). Це свідчить про незначний рівень коагуляції наночастинок золота. Плазмозамінники «Стабізол» та «Реополіглюкін» не впливають на характеристики піків абсорбції наночастинок золота (рис. 3 В, криві 3, 4 та Г, криві 3, 4), що свідчить про стабільність препаратів наночастинок золота в цих модельних системах.

Більш виражено на стабільність синтезованих наночастинок золота впливають розчини модельних систем крові, кінцева концентрація яких у контактній суміші складає 50% (рис. 4, А-Г).

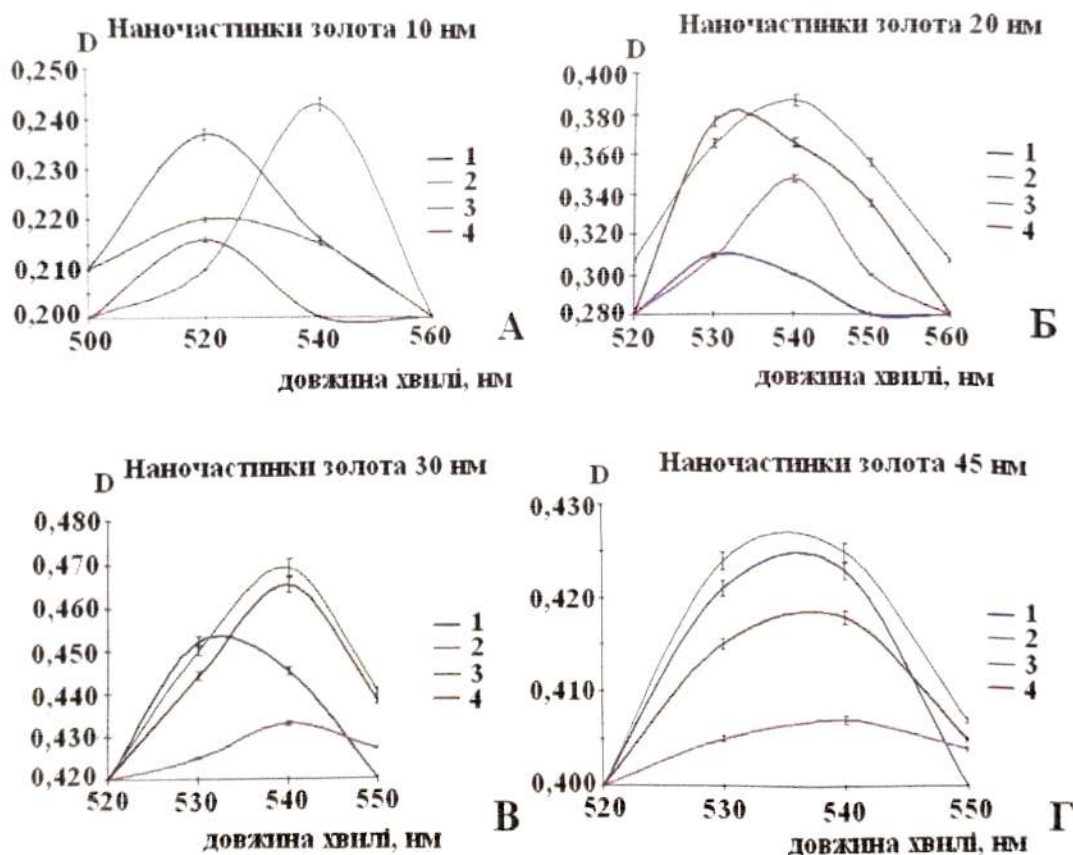


Рис. 4. Стабільність водних дисперсій наночастинок золота розміром 10 нм (А), 20 нм (Б), 30 нм (В) та 45 нм (Г) після 30 хв інкубації у модельних системах крові, кінцева концентрація яких складає 50 %: крива 1 – контроль, НЗ : вода = 1:1 (по об'єму); крива 2 – НЗ : фізіологічний розчин = 1:1; крива 3 – НЗ : плазмозамінник «Стабізол» = 1:1; крива 4 – НЗ : плазмозамінник «Реополіглюкін» = 1:1 ($M \pm m$; $n=5$; $P < 0,05$).

Так, під впливом фізіологічного розчину положення максимуму піку абсорбції наночастинок золота розміром 10 нм змінюється з 520 на 540 нм. Це свідчить про коагуляцію наночастинок та, як наслідок, істотне збільшення їх розміру (рис. 4 А, крива 2), порівняно з контролем (крива 1). Максимум піку поглинання

наночастинок середнього розміру 45 нм спостерігається при 538 ± 1 нм. Отже, в результаті коагуляції під впливом 50% фізіологічного розчину розмір наночастинок золота розміром 10 нм збільшується більш ніж у 4 рази.

Плазмозамінники «Стабізол» (А, крива 3) та «Реополіглюкін» (А, крива 4) практично не впливають на стабільність наночастинок золота розміром 10 нм.

Для наночастинок розміром 20 нм крива стабільності при контакті з фізіологічним розчином (Б, крива 2) характеризується зміною положення максимуму піку абсорбції, порівняно з контролем (Б, крива 1), що свідчить про коагуляцію наночастинок до середнього розміру 45 нм. При контакті з плазмозамінниками рівень коагуляції незначний (Б, криві 3, 4): збільшення середнього розміру наночастинок не перевищує 5 нм.

Розмір наночастинок золота 30 нм у результаті коагуляції збільшується не більш ніж на 5 нм при контакті з плазмозамінниками (В, криві 3, 4) та в середньому на 10 нм при контакті з фізіологічним розчином (В, крива 3).

Рівень коагуляції наночастинок золота розміром 45 нм є незначним при контакті з фізіологічним розчином (Г, крива 2) та залишається незмінним при контакті з плазмозамінниками «Стабізол» (Г, крива 3) та «Реополіглюкін» (Г, крива 4) [9].

Таким чином, підсумовуючи дані, наведені на рис. 3 і 4 можна зазначити, що водні дисперсії наночастинок золота, отримані методом хімічної конденсації (рис. 1), характеризуються високим рівнем стабільності за умов використання плазмозамінників у якості модельних систем. Імовірним механізмом, що пояснює їх стабільність в цих модельних системах, є утворення абсорбційного шару високомолекулярних сполук на поверхні наночастинок, який перешкоджає їх агрегації.

Підвищення рівня коагуляції при використанні в якості модельної системи фізіологічного розчину може бути обумовлено впливом одновалентних катіонів Na^+ на заряд наночастинок. Наночастинки золота, для яких наведені експериментальні дані, характеризуються незначним негативним зарядом, тому одновалентні катіони здатні знижувати електрокінетичний потенціал наночастинок, що призводить до їх коагуляції.

Особливості взаємодії наночастинок золота різного розміру з білками. Наночастинки золота, так само як і наночастинки інших металів, володіють значним потенціалом регулювання внутрішньоклітинних процесів, зокрема на рівні взаємодії білок-білок, білок-нуклеїнова кислота та регуляції ферментативної активності. Логічно припустити, що механізми такої взаємодії у фізіологічних умовах (рН 7,4-7,6) будуть визначатись, з одного боку, особливостями структури та сумарним зарядом молекул білків, а з іншого – природою, структурним складом та розміром наночастинок. Отже, молекули білків, залежно від їх фізико-хімічних властивостей, можуть певним чином взаємодіяти з наночастинками золота, модифікувати їх поверхню і як наслідок, сприяти агрегації або стабілізації наночастинок.

Так, при дослідженні особливостей взаємодії трьох білків (сироваткового альбуміну людини (САЛ), трипсину та лізоциму) з наночастинками золота середнього розміру 20 і 30 нм виявлений ряд закономірностей, пов'язаний, перш за все, із значенням ізоелектричної точки білків та розміром наночастинок. Експериментально встановлено, що сироватковий альбумін людини не виявляє здатності до взаємодії з наночастинками золота розміром 20 нм. Виявлені особливос-

ті обумовлені тим, що в умовах експерименту (рН 7,4-7,6) білкова молекула САЛ несе сумарний негативний заряд (її ізоелектрична точка складає 4,5-4,9), як і наночастинки золота. Проте при взаємодії цього білку з наночастинками золота розміром 30 нм спостерігається процес флокуляції у діапазоні концентрацій білка 10-70 мкг/мл, рівень якої не перевищує 40 %, ймовірно обумовлений розмірним ефектом наночастинок золота.

При взаємодії з трипсином при тих же умовах експерименту в концентраційному діапазоні 1-100 мкг/мл має місце флокуляція досліджених наночастинок золота обох розмірів. У цьому випадку визначальним фактором взаємодії є сумарний позитивний заряд білкової молекули.

Взаємодія лізоциму з наночастинками золота характеризується особливими властивостями. Так, флокуляція наночастинок золота розміром 20 нм спостерігається в інтервалі концентрацій білку 1-10 мкг/мл. Подальше підвищення вмісту білку до 30 мкг/мл призводить до стабілізації системи білок-наночастинка.

При взаємодії лізоциму з наночастинками золота розміром 30 нм виявлені три концентраційні діапазони білку, які визначають агрегативну стійкість системи. Так, при концентраціях лізоциму в діапазонах 1-50 мкг/мл та 70-100 мкг/мл спостерігається активна флокуляція, а при концентраціях 50-70 мкг/мл - стабілізація наночастинок золота розміром 30 нм [40, 68].

Таким чином, визначальними факторами взаємодії білкових молекул з наночастинками золота є їх структура та фізико-хімічні властивості в заданих конкретних умовах середовища контакту.

Особливості взаємодії наночастинок золота з бактеріальними клітинами. Бактеріальні клітини, завдяки унікальним структурним властивостям та обміну речовин здатні активно контактувати з мінеральними компонентами оточуючого середовища, до яких відносяться і наночастинки металів, зокрема золота. З іншого боку, бактерії суттєво, часто різноспрямовано, впливають на організм людини і тварин [1, 14, 16].

Дослідження впливу наночастинок золота на функціональний стан бактеріальних клітин свідчать про можливість контролювання та управління інтенсивністю їх фізіолого-біохімічних реакцій [6, 63]. Виявлена здатність деяких інтактних мікроорганізмів селективно концентрувати наночастинки золота середнього розміру 15-20 нм [13, 18, 19]. Інактивація мікроорганізмів, що володіють цими властивостями, призводить до значного зниження або навіть цілкової втрати цієї особливості.

Механізми і процеси стадії селективної взаємодії інтактною бактеріальною клітиною з наночастинкою розвиваються на основі фізико-хімічної моделі подвійного електричного шару живої клітини, яка встановлює взаємозв'язок між поверхневим зарядом клітини і відповідною величиною трансмембранного потенціалу [40]. Модель такого біоспецифічного подвійного шару побудована на розгляді двох його головних параметрів: рівноважного електричного потенціалу ψ_s , який виникає у результаті дисоціації функціональних груп на поверхні клітини, і нерівноважного потенціалу ϕ_s , який виникає внаслідок активного транспорту протонів. Використання такого підходу дозволило знайти шляхи регулювання спрямованості і ефективності гетерокоагуляції клітини і частинки в залежності від природи, заряду, розміру частинки і фізіологічного стану клітини [31].

Біохімічно важливими факторами, що відповідають за процес акумулювання клітиною наночастинок золота розміром 15-20 нм на її поверхні, є генерація

трансмембранного потенціалу як результат функціонування дихального ланцюга та мембранної АТР-ази. Дані, які характеризують цей процес, наведені на рис. 5.

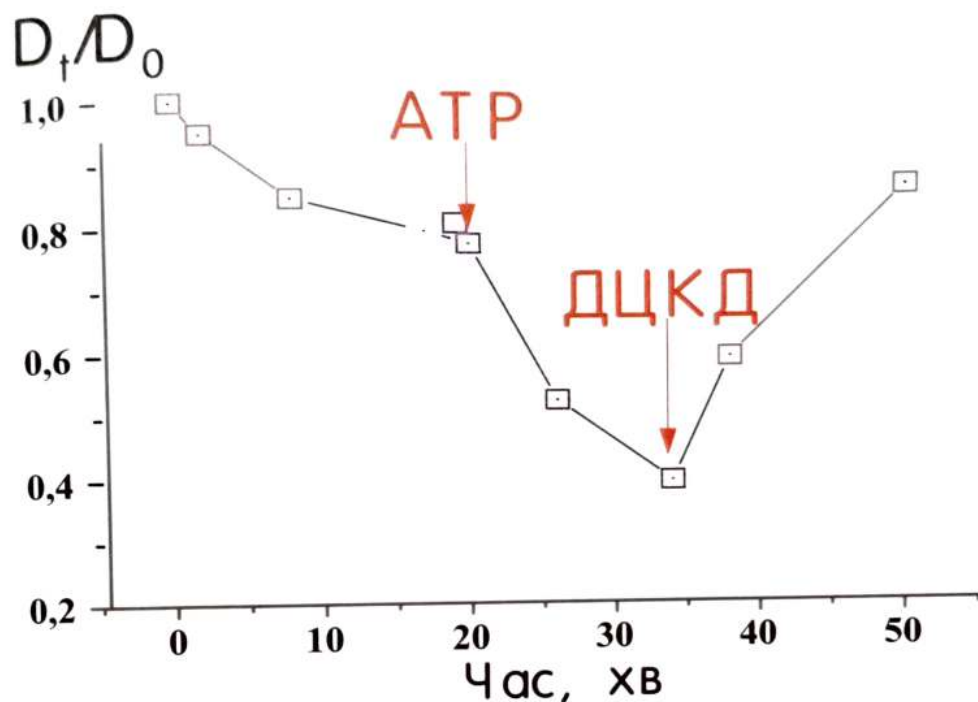


Рис. 5. Енергозалежний механізм взаємодії клітин золотодільних бактерій з наночастинками золота розміром 15-20 нм [31].

Так, накопичення металу підсилюється при введенні в систему енергетичного субстрату АТР і переходить у зворотній процес вивільнення наночастинок золота в розчин при додаванні дициклогексилкарбодіміду (ДЦКД) – високоспецифічного інгібітора АТР-ази. Зі збільшенням часу контакту наночастинок золота і клітини фізична адгезія наночастинок золота на поверхні клітин переходить у хімічну взаємодію за участі функціональних груп на поверхні клітинної мембрани, зокрема карбоксильних COOH^- та тіолових SH^- [34, 78, 79].

У клітинних оболонках золотодільних бактерій *Vacillus sp.* виявлені вискополімерні структури глікопротеїнової природи (молекулярна маса 50 кДа), які активно зв'язують наночастинок золота завдяки наявності в їх структурі позитивно заряджених аміногруп NH_2^+ [32]. Такі структурні компоненти виступають як своєрідні клітинні рецептори, що сприяють процесу специфічної взаємодії клітини з наночастинок золота.

При порівнянні структур глікопротеїнової природи, виділених з клітинних оболонок активних та неактивних штамів бактерій, встановлено, що незважаючи на близькі характеристики молекулярної маси, ці глікопротеїди характеризуються різним значенням рН їх ізоелектричної точки (рІ) [13, 18, 19]. Глікопротеїди активних та неактивних штамів бактерій мають значення ізоелектричних точок рІ 11 та рІ 5 відповідно. Наявність такого роду структур обумовлює мовчазність заряду поверхні бактеріальних клітин із появою специфічних ділянок

на їх поверхні, активних відносно взаємодії з наночастинками золота. Відмінність значень ізоелектричної точки глікопротеїдів активних та неактивних штамів може бути обумовлена стеричними факторами та конформаційними змінами макромолекули глікопротеїду та свідчити про причетність цієї молекулярної структури до транспорту наночастинок золота, ймовірно обумовленого існуванням мембранного каналу.

Акумулювання наночастинок золота може відбуватися не тільки на поверхні, але і всередині клітини, про що свідчать дані електронно-мікроскопічних знімків зрізів клітин золотofilного штаму бактерій після їх контакту з наночастинками золота (рис. 6) [13, 18, 19].

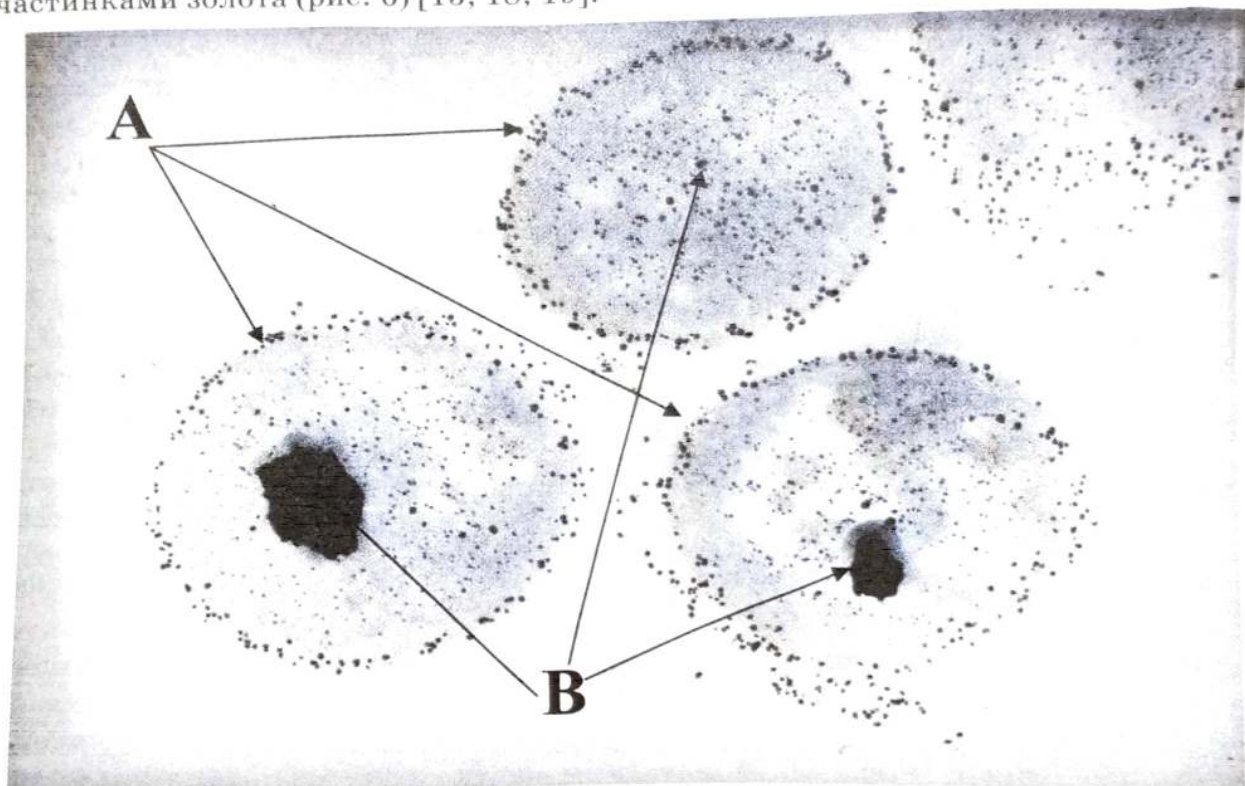


Рис. 6. Акумулювання наночастинок золота на поверхні (А) та всередині (В) клітин золотofilного штаму *Bacillus sp* [31].

Доведена можливість трансмембранного переносу наночастинок золота в клітинах золотofilних бактерій, а також визначені молекулярні структури і механізми, відповідальні за цей процес. У досліджуваних клітинах була ідентифікована АТР-азна активність, що складається з двох компонент: азид-чутливої (63%) та азид-резистентної (37%). При цьому азид-чутлива компонента АТР-азної активності пов'язана з функціонуванням дихального ланцюга клітини бактерій, локалізованого в плазматичній мембрані, а азид-резистентна компонента може складати молекулярну основу трансмембранного переносу наночастинок золота всередину клітини [7, 8, 33]. Це однозначно свідчить про енергозалежність процесу акумулювання наночастинок золота бактеріальними клітинами та підкреслює важливу роль мембранних ферментів у процесі взаємодії наночастинок золота з клітиною. Ці результати можуть слугувати підтвердженням припущення щодо існування каналу транспортування наночастинок золота в бактеріальну клітину [7, 8, 33].

Особливо слід зазначити, що активна взаємодія з наночастинками золота різного розміру притаманна не лише золатофільним штамам бактерій. Так, вплив наночастинок золота розміром 15-20 нм на інтенсивність росту бактеріального штаму *Escherichia coli* 1257 характеризується концентраційним оптимумом: у присутності наночастинок золота в концентрації $5 \cdot 10^{-6}$ мкг/мл у середовищі спостерігається стимуляція росту бактеріальних клітин, яка перевищує контрольні значення у середньому на 15 %. Інший показник функціонального стану бактеріальних клітин – швидкість викиду протонів, що відображає роботу мембранної H^+ -АТР-ази, за дії концентрацій наночастинок золота $5 \cdot 10^{-9}$ - $5 \cdot 10^{-7}$ мкг/мл не змінюється. Наночастинки золота в концентраціях $5 \cdot 10^{-7}$ - $5 \cdot 10^{-6}$ мкг/мл призводять до підвищення рівня закиснення середовища, а у концентраціях $5 \cdot 10^{-4}$ - $5 \cdot 10^{-1}$ мкг/мл пригнічують швидкість викиду протонів [3, 6].

На рис. 7 наведені дані трансмісійної електронної мікроскопії, які свідчать про активну взаємодію наночастинок золота середнього розміру 30 нм з бактеріальними клітинами штаму-продуценту *E. coli* №4.

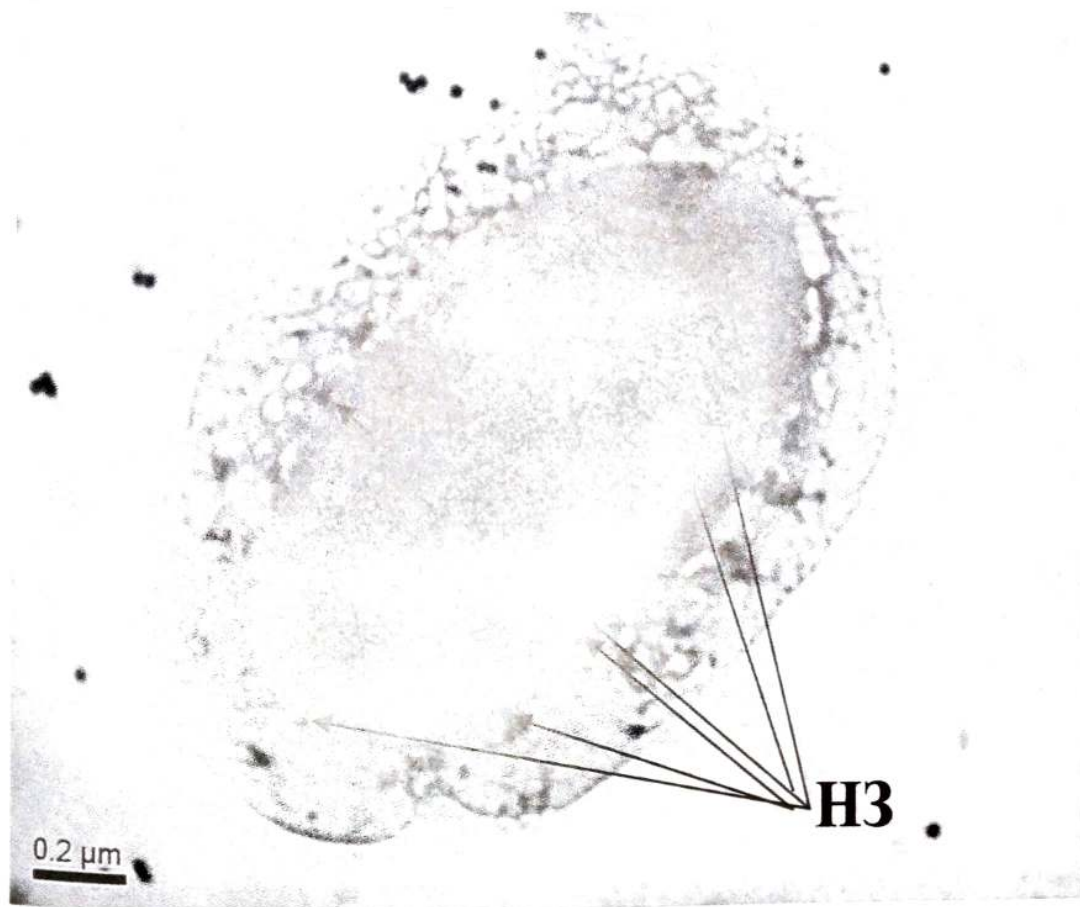


Рис. 7. Бактеріальна клітина штаму-продуценту *E. coli* № 4 з акумульованими наночастинками золота (НЗ) середнього розміру 30 нм.

Електронно-мікроскопічні зображення, як і дані конфокальної мікроскопії, вказують на неоднорідність розподілу наночастинок золота при їх контакті з бактеріальними клітинами штаму-продуценту.

Така картина може бути обумовлена наявністю у цих клітинах специфічних молекулярних структур та біохімічних процесів, відповідальних за взаємодію з наночастинками золота.

Вплив наночастинок золота різного розміру на H^+ -АТФ-азну активність бактеріальних клітин. Властивість бактеріальних клітин до ефективної взаємодії з наночастинками золота визначається низкою факторів, серед яких, одним з ключових, є величина трансмембранного потенціалу, що генерується на плазматичній мембрані в результаті перерозподілу протонів між цитоплазмою та зовнішнім середовищем при функціонуванні мембранної H^+ -АТФ-ази та дихального ланцюга [7, 8, 33, 78].

Мембранна H^+ -АТФ-аза є основним генератором трансмембранного потенціалу бактеріальної клітини, який забезпечує трансмембранне перенесення протонів за умов наявності енергетичних субстратів у середовищі інкубації [4]. За структурними та функціональними особливостями бактеріальну H^+ -АТФ-азу відносять до F_1F_0 -типу: гідрофільний глобулярний F_1 -комплекс містить місця зв'язування нуклеотидів та функціонує у якості АТФ-ази, а мембранозв'язаний F_0 -комплекс функціонує як канал, що проводить протони (H^+). F_1 - та F_0 -комплекси можуть відокремлюватись один від одного [4, 56, 72]. Цей тип АТФ-аз притаманний більшості бактеріальних клітин.

Зважаючи на ключову роль цього ферменту в життєдіяльності бактеріальної клітини, вивчення його активності за умов впливу наночастинок золота є інформативним показником біохімічної активності даних наночастинок.

Визначена низка особливостей впливу наночастинок золота різного розміру на H^+ -АТФ-азну активність мембранних фракцій бактеріальних клітин штамів-пробіонтів та виробничих штамів-продуцентів вакцин [23, 25].

Так, інкубація наночастинок золота середнього розміру 10, 20, 30 і 45 нм у концентраціях 0,11-1,10 мкг/мл за металом з мембранними фракціями клітин штамів-пробіонтів *Escherichia coli* Г35№1-413 та *Enterococcus faecalis* Г35№4-410 не викликає суттєвих змін величин гідролізу АТФ. Стимуляція цього показника для обох штамів в середньому сягає 5-10 %, порівняно з контролем.

Аналіз характеру впливу наночастинок золота середнього розміру 20, 30 і 45 нм на H^+ -АТФ-азну активність мембранних фракцій нативних та регідратованих після ліофілізації бактеріальних клітин виробничих штамів-продуцентів вакцин (*E.coli* №4, 19, 20, 24, 25, 57 з колекції Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів) свідчить про достовірне підвищення рівня гідролізу АТФ за умов впливу наночастинок золота певного розміру. На рисунках 8 та 9 наведені дані щодо впливу наночастинок золота середніх розмірів 20, 30 і 45 нм на величини H^+ -АТФ-азних активностей мембранних фракцій нативних та регідратованих після ліофілізації бактеріальних клітин виробничих штамів *E.coli* № 24 та *E.coli* № 57 відповідно.

Так, під дією наночастинок золота розміром 20 нм достовірних змін у значенні ферментативної активності, порівняно з контролем, не спостерігається ані для нативних, ані для регідратованих клітин усіх досліджених виробничих штамів. Виключення складають нативні та регідратовані клітини штаму *E.coli* №24 та регідратовані клітини штаму *E.coli* №57. Для нативних та ліофілізованих/регідратованих клітин штаму *E.coli* №24 H^+ -АТФ-азна активність мембранної фракції за умов впливу досліджуваних концентрацій (0,0125 – 0,2 мкг металу/мкг білку) наночастинок золота розміром 20 нм підвищується у середньому на 20-30% порівняно з контрольним значенням ферментативної активності (при відсутності контакту мембранної фракції з наночастинками золота) (рис. 8 А, крива 1; Б, крива 1).

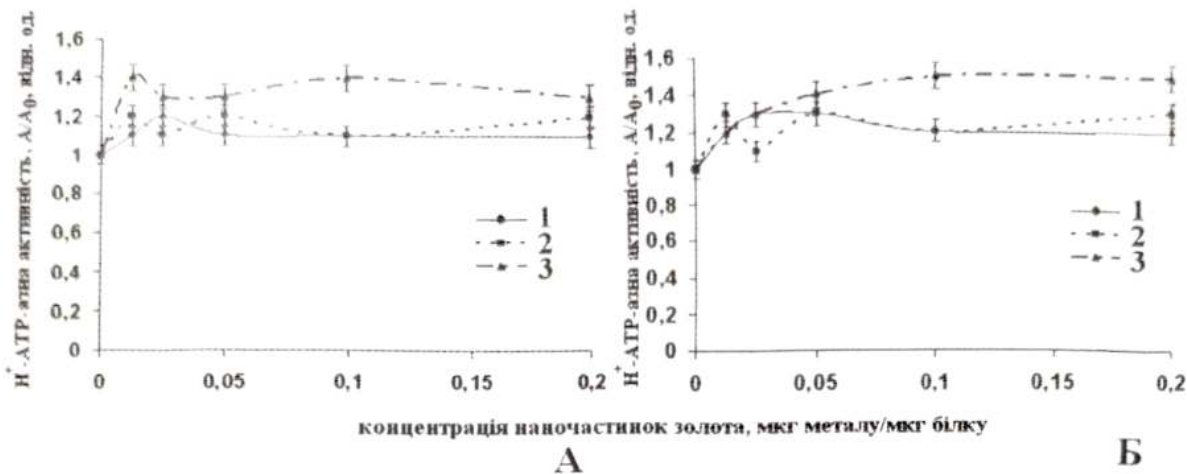


Рис. 8. Н⁺-АТФ-азна активність мембранної фракції нативних (А) та ліофілізованих/регідратованих (Б) клітин виробничого штаму *E. coli* №24 за умов впливу наночастинок золота розміром: 1 – 20 нм; 2 – 30 нм; 3 – 45 нм ($M \pm m$; $n=5$; $P < 0,05$ відносно контролю - A_0). За одиницю прийняте значення величини Н⁺-АТФ-азної активності мембранної фракції нативних (А) та ліофілізованих/регідратованих (Б) клітин за відсутності наночастинок золота.

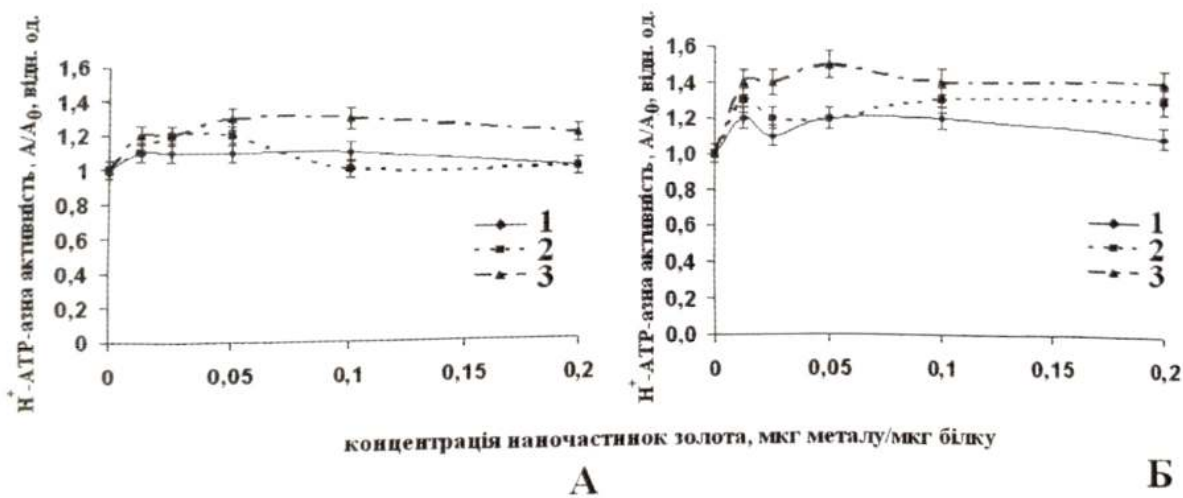


Рис. 9. Н⁺-АТФ-азна активність мембранної фракції нативних (А) та ліофілізованих/регідратованих (Б) клітин виробничого штаму *E. coli* №57 за умов впливу наночастинок золота розміром: 1 – 20 нм; 2 – 30 нм; 3 – 45 нм ($M \pm m$; $n=5$; $P < 0,05$ відносно контролю - A_0). За одиницю прийняте значення величини Н⁺-АТФ-азної активності мембранної фракції нативних (А) та ліофілізованих/регідратованих (Б) клітин за відсутності наночастинок золота.

Для регідратованих клітин штаму *E. coli* №57 за умов впливу наночастинок розміром 20 нм активація процесу гідролізу АТФ досягає 20% (рис. 9 Б, крива 1), однак у препаратах мембранних фракцій нативних клітин цього штаму підвищення рівня гідролізу АТФ не перевищує 10% (рис. 9 А, крива 1).

Наночастинок золота середнього розміру 30 нм, порівняно з наночастинками розміром 20 нм, виявляють стимулюючий вплив на величину Н⁺-АТФ-азної активності мембранних фракцій бактеріальних клітин усіх досліджених штамів-продуцентів вакцин (*E. coli* №4, 19, 20, 24, 25, 57) як у нативному, так і у регідратованому стані після ліофілізації. Рівень гідролізу АТФ за умов

впливу наночастинок золота цього розміру підвищується, у середньому, на 10-20%, а інколи сягає 30%. Зміни величини H^+ -АТФ-азної активності за умов впливу наночастинок золота розміром 30 нм проілюстровані на прикладі штамів *E. coli* №24 (рис. 8 А, крива 2; Б, крива 2) та *E. coli* №57 (рис. 9 А, крива 2; Б, крива 2).

Найбільш виражений стимулюючий ефект на величину H^+ -АТФ-азної активності мембранних фракцій як нативних, так і регідратованих після ліофілізації клітин виробничих штамів, виявляється у присутності наночастинок золота розміром 45 нм. Підвищення ферментативної активності за дії наночастинок цього розміру складає, у середньому, 30-40% та інколи сягає 50%.

Отже, наночастинок золота, синтезовані методом хімічної конденсації, залежно від розміру виявляють здатність стимулювати на 20-40% H^+ -АТФ-азну активність мембранних фракцій як нативних, так і ліофілізованих/регідратованих клітин *E. coli* – виробничих штамів-продуцентів вакцин.

Наявність такого достовірно стимулюючого ефекту на мембранну H^+ -АТФ-азу може бути обумовлена наступними факторами. Наночастинок золота володіють добре розвиненою активною поверхнею, площа якої визначається їх розміром та забезпечує високу реакційну здатність наночастинок [20, 36]. При цьому каталітична дія наночастинок золота може бути реалізована через безпосередній вплив на сам фермент (взаємодія з функціональними зарядженими групами білкової молекули, що приводить до певних конформаційних змін). Не виключається можливість хімічної взаємодії наночастинок з ліпідним оточенням цього мембранозв'язаного ферменту, що може викликати функціональні зміни його активності [21, 35].

Вплив наночастинок золота на проникність клітинної оболонки бактеріальних клітин. Проникність клітинної оболонки є важливим показником функціонального стану бактеріальних клітин [37].

Ключова роль клітинної оболонки в забезпеченні нормального функціонування бактеріальних клітин обумовлена, перш за все, її структурними особливостями. Найбільш виражено розрізняються оболонки грам-позитивних та грам-негативних бактерій. Так, до складу оболонки грам-позитивних бактеріальних клітин входять цитоплазматична (внутрішня) мембрана та пептидоглікан. Грам-негативні бактеріальні клітини додатково містять зовнішню мембрану, яка структурно подібна до цитоплазматичної, проте не містить ферментних систем, а виконує захисну функцію [37, 61].

Пептидоглікан являє собою полімер, до складу якого входять N-ацетилглюкозамін та N-ацетилмурамова кислота, що зв'язані між собою пептидним зв'язком. Пептидоглікан утворює каркас, який забезпечує форму та стійкість до руйнуючих факторів бактеріальних клітин [29, 37].

Клітинна оболонка ефективно захищає бактеріальну клітину від дії негативних факторів оточуючого середовища. Зменшення її міцності або руйнування призводить, у більшості випадків, до загибелі клітини. Наночастинок золота різного розміру по різному впливають на рівень проникності клітинної оболонки грам-негативних та грам-позитивних бактерій. Так, при дії наночастинок золота на проникність клітинної оболонки грам-негативного штаму *Escherichia coli* Г35 №1-413 спостерігається їх переважний стабілізуючий вплив (рис. 10).

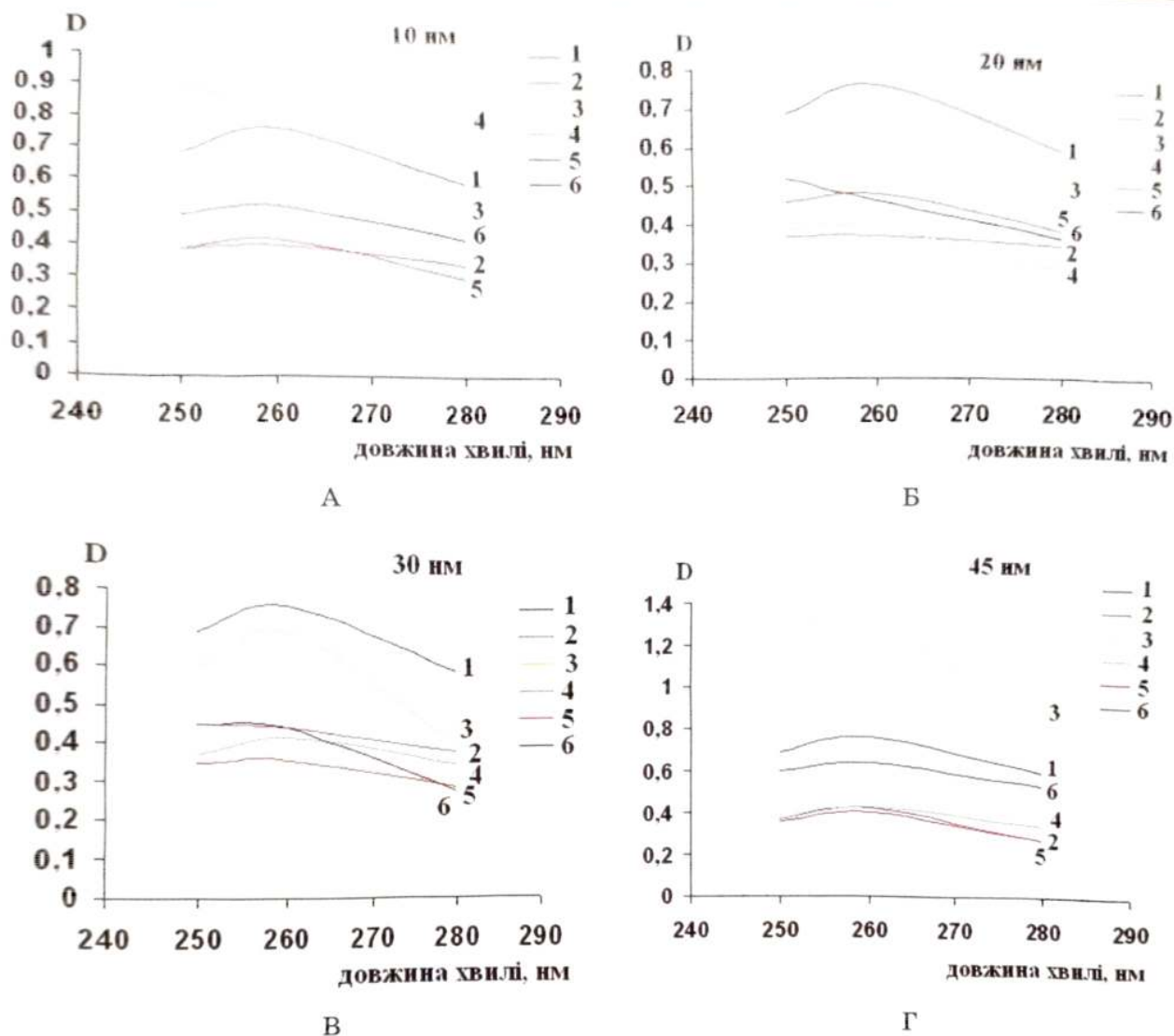


Рис. 10. Рівень проникності клітинної оболонки (D) грам-негативного штаму *Escherichia coli* Г35 №1-413 після інкубації клітин протягом 40 хвилин з наночастинками золота розміром 10 нм (А), 20 нм (Б), 30 нм (В) та 45 нм (Г) у концентраціях: 1 – контроль (відсутність наночастинок золота); 2 – 1,1 мкг/мл за металом; 3 – 1,38 мкг/мл за металом; 4 – 2,77 мкг/мл за металом; 5 – 5,53 мкг/мл за металом; 6 – 11,06 мкг/мл за металом.

Дані спектрів, які характеризують вихід внутрішньоклітинних метаболітів у зовнішнє середовище, свідчать, що за умов впливу наночастинок золота середнього розміру 20 нм (рис. 10 Б, криві 2-6) і 30 нм (рис. 10 В, криві 2-6) у всіх досліджених концентраціях спостерігається зменшення рівня проникності клітинної оболонки, порівняно з контрольним значенням (Б, крива 1; В, крива 1).

Наночастинки розміром 10 нм і 45 нм переважно виявляють стабілізуючу дію на клітинну оболонку грамнегативного штаму *E. coli* Г35 №1-413. Однак за концентрації 2,77 мкг/мл наночастинок золота розміром 10 нм (А, крива 4) та за концентрації 1,38 мкг/мл наночастинок золота розміром 45 нм (Г, крива 3) спостерігається підвищення виходу внутрішньоклітинних метаболітів у зовнішнє середовище, що є свідченням підвищення рівня проникності клітинної оболонки бактеріальних клітин цього штаму.

Стабілізуючий вплив наночастинок золота на клітинну оболонку грамнегативних бактерій можна пояснити стеричним фактором взаємодії наночасти-

нок певного розміру з поверхнею клітини. Зокрема, можливе блокування пор, що призводить до зниження рівня виходу внутрішньоклітинних метаболітів у зовнішнє середовище.

Для грам-позитивного штаму *Enterococcus faecalis* Г35 №4-410 виявляються інші закономірності. Так, лише за дії наночастинок золота середнього розміру 20 нм у концентрації 1,38 мкг/мл за металом (рис. 11 Б, крива 3), та наночастинок розміром 30 нм у концентрації 1,10 мкг/мл за металом (рис. 11 В, крива 2) проникність клітинної оболонки знижується.

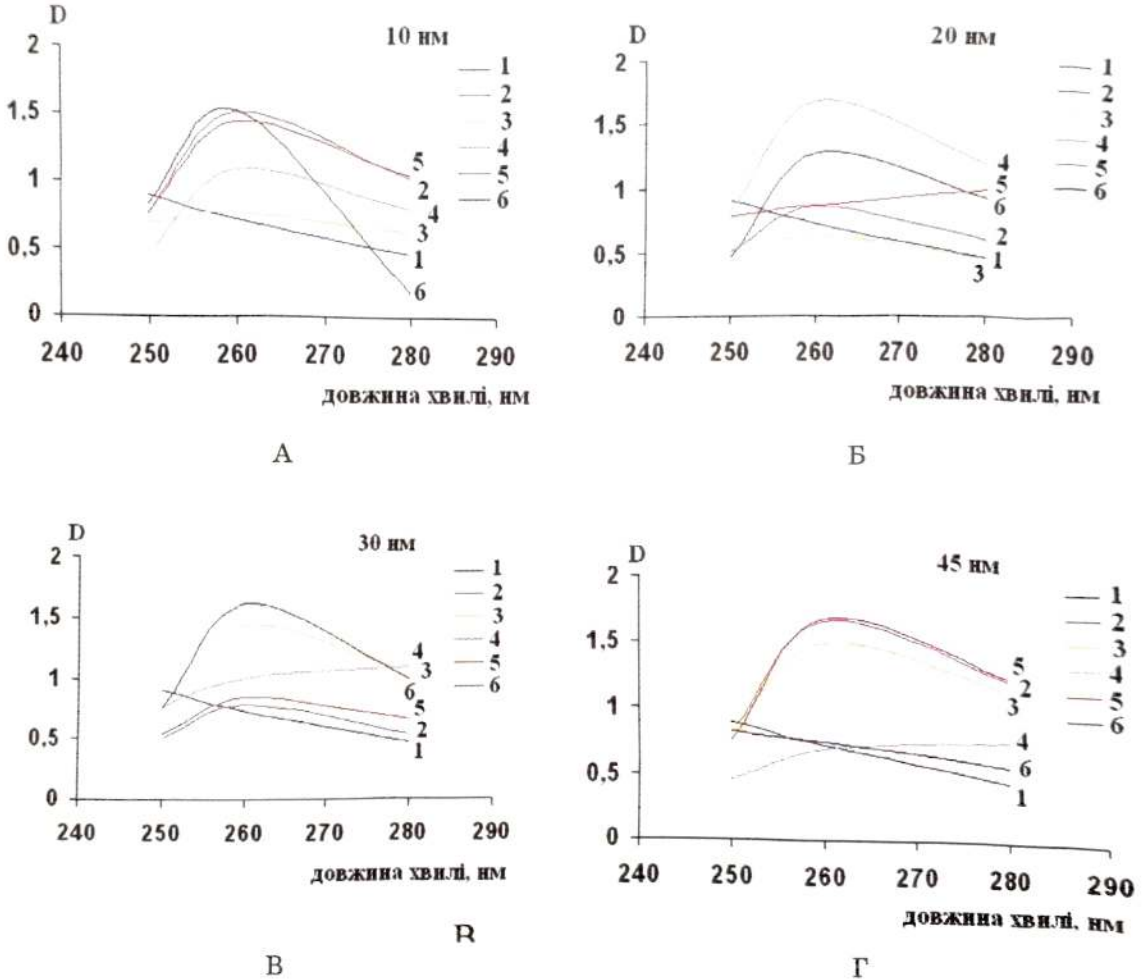


Рис. 11. Рівень проникності клітинної оболонки (D) грам-позитивного штаму *Enterococcus faecalis* Г35 №4-410 після інкубації клітин протягом 40 хвилин з наночастинками золота розміром 10 нм (А), 20 нм (Б), 30 нм (В) та 45 нм (Г) у концентраціях: 1 – контроль (відсутність наночастинок золота); 2 – 1,1 мкг/мл за металом; 3 – 1,38 мкг/мл за металом; 4 – 2,77 мкг/мл за металом; 5 – 5,53 мкг/мл за металом; 6 – 11,06 мкг/мл за металом.

За інших концентрацій наночастинок золота розміром 20 нм (Б, криві 2, 4-6) і 30 нм (В, криві 3-6), а також під впливом наночастинок розміром 10 нм (А, криві 2-6) і 45 нм (Г, криві 2-6) спостерігається підвищення рівня проникності клітинної оболонки грам-позитивного штаму *Ent. faecalis* Г35 №4-410, порівняно з контролем (А-Г, криві 1).

Щодо механізму впливу, який призводить до підвищення рівня проникності клітинної оболонки грам-позитивних бактеріальних клітин, можна припустити,

що наночастинки золота зв'язуються з функціональними групами пептидоглікану та тейхоевих кислот, розташованих із зовнішнього боку клітинної оболонки. Внаслідок цього відбувається локальне структурування у місцях хімічного зв'язування наночастинок з появою дестабілізованих ділянок оболонки грам-позитивної бактеріальної клітини, що призводить до підвищення її проникності.

β-лактамазна активність бактеріальних клітин за дії наночастинок золота. Серед показників, які відіграють суттєву роль у функціонуванні багатьох типів бактеріальних клітин, особливо штамів-пробіонтів та патогенних штамів, слід зазначити β-лактамазну активність. β-лактамази являють велику групу генетично та функціонально різноманітних ферментів, що здатні руйнувати β-лактамі антибіотики [17, 27].

При конструюванні пробіотичних препаратів з метою аналізу стійкості та можливих сфер застосування штамів-пробіонтів, що входять до складу пробіотиків, β-лактамазна активність набуває значення індикаторного показника функціонального стану бактеріальної клітини.

Проведені експериментальні дослідження щодо особливостей впливу наночастинок золота на β-лактамазну активність штаму-пробіонту *E. coli* Г35 №1-413 виявили стимуляцію β-лактамазної активності, у середньому, на 30 % в діапазоні концентрацій 0,11-0,28 мкг/мл за металом [22]. Проте в діапазоні концентрації 0,3-1,1 мкг/мл за металом наночастинки розміром 10 нм інгібували цю ферментативну активність на 80 % (рис. 12, крива 1).

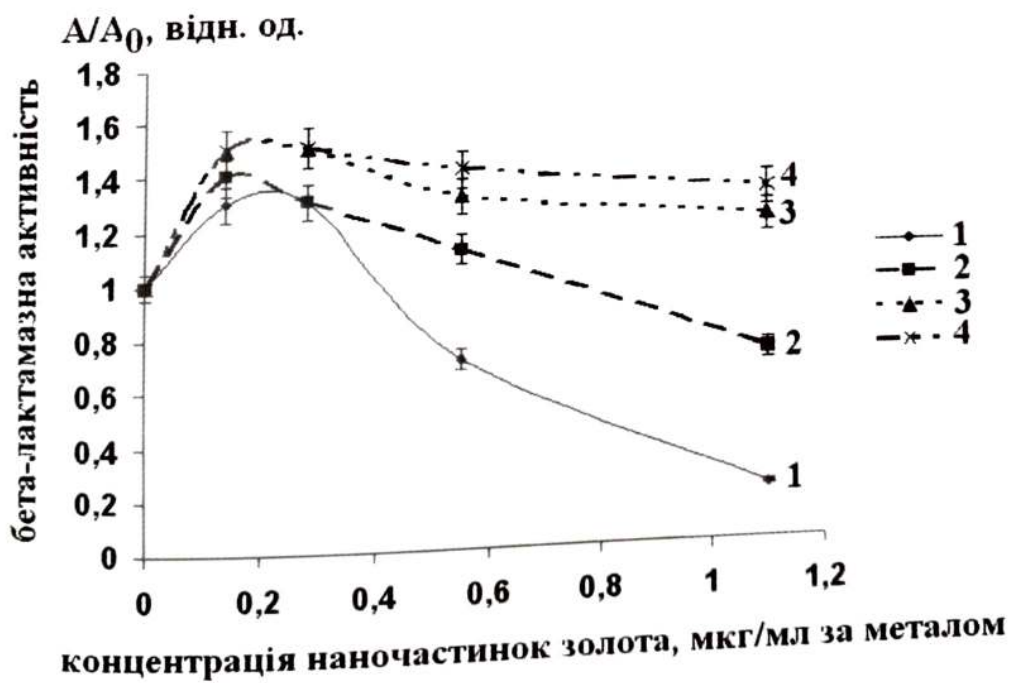


Рис. 12. β-лактамазна активність (A/A_0 , відн. од.) клітин штаму *Escherichia coli* Г35 №1-413 після 40 хв інкубації нативних клітин з наночастинками золота розміром: 1 – 10 нм, 2 – 20 нм, 3 – 30 нм, 4 – 45 нм ($M \pm m$; $n=5$; $P < 0,05$ відносно контролю - A_0). За одиницю прийняте значення β-лактамазної активності клітин без впливу наночастинок золота.

Вплив наночастинок золота розміром 20 нм у діапазоні концентрацій 0,1-1,1 мкг/мл за металом характеризувався інгібуванням β-лактамазної активності на 30 % (крива 2).

За дії наночастинок золота розміром 30 та 45 нм у всьому дослідженому концентраційному діапазоні спостерігається підвищення β -лактамазної активності бактеріальних клітин штаму-пробіонту *E. coli* Г35 №1-413, у середньому, на 30-50% (криві 3, 4).

Таким чином, наночастинки золота певного розміру можуть викликати активацію β -лактамазної активності бактеріальних клітин внаслідок зміни конформаційного стану білкової макромолекули в результаті взаємодії наночастинок з функціональними зарядженими групами.

Особливості взаємодії наночастинок золота з еукаріотичними клітинами. Дослідження особливостей взаємодії наночастинок золота з еукаріотичними клітинами має суттєве значення у зв'язку з їх ефективністю та перспективністю застосування у боротьбі з онкологічними, серцево-судинними захворюваннями, тощо. Разом з цим, дані щодо біохімічних ефектів впливу наночастинок золота різного розміру на еукаріотичні клітини є досить обмеженими та розрізненими.

Розмір наночастинок може бути співставлений із розмірами біомолекул – компонентів клітин. Розмірний діапазон наночастинок золота (1-100 нм) обумовлює, поряд з особливими хімічними властивостями, їх унікальний характер впливу на клітинному рівні.

Так, наночастинки золота середнього розміру 9 нм інгібують активність ізоферментів цитохрому P450 (CYP 450 1A2; CYP 450 2C9; CYP 450 2C19; CYP 450 3A4). Механізм інгібуючого впливу наночастинок на активність цього гемпротеїду не з'ясований, проте, ймовірно, пов'язаний з фізико-хімічними характеристиками цих наночастинок та гідрофобним оточенням гему молекули P450, що обумовлює можливість наночастинок золота конкурувати з субстратом ферменту [75].

Наночастинки золота середнього розміру 2 нм, функціоналізовані 2-(10-меркаптодецил)малоновою кислотою, виявляють шаперон-подібні властивості і здатні впливати на фолдинг білків та фібрилогенез [52]. Шаперон-подібні властивості наночастинок золота відкривають нові перспективи в створенні лікарських препаратів, у тому числі для лікування захворювань мозку. Проте, з іншого боку, зазначають необхідність вивчення токсичного впливу наночастинок золота.

Кон'югація наночастинок золота з плазмідними ДНК та нуклеотидними послідовностями підвищує рівень їх проникнення у еукаріотичні клітини. Кон'югати, отримані у фізіологічно-прийнятних умовах, здатні проходити крізь мембрану без її ушкоджень та руйнування [76]. Це відкриває нові перспективи як для фундаментальних досліджень у галузі молекулярної біології, генетики, біохімії, фармакології, так і для прикладних завдань з розробки діагностикумів.

До унікальних властивостей наночастинок золота, які мають велике значення для медицини та фармакології, відноситься здатність з різною інтенсивністю розсіювати або абсорбувати світло у видимій або близькій інфрачервоній частині спектру. Це явище дістало назву поверхневого плазмонного резонансу (ППР), і дозволяє застосовувати наночастинки золота в техніках оптичної візуалізації *in vivo*, таких як фотоакустика та двофотонна люмінесценція. Оскільки в близькій інфрачервоній області (700-900 нм) абсорбція усіх біомолекул є мінімальною, це забезпечує чітку оптичну візуалізацію з використанням наночастинок золота. Пік ППР може бути налаштований шляхом зміни фізико-хімічних характеристик наночастинок [11, 43].

Легкість модифікації поверхні та значний коефіцієнт поглинання рентгенівського випромінювання забезпечують високоефективне використання наночастинок золота в якості контрастних агентів у інших неінвазивних діагностичних методах, таких як магнітно-резонансна томографія та рентгенівська комп'ютерна томографія [45, 51, 54, 60, 80].

Унікальні властивості наночастинок золота роблять їх перспективним агентом у фототермальній терапії онкологічних захворювань, оскільки наночастинок золота володіють здатністю трансформувати оптичне випромінювання у тепло, що обумовлює термічне руйнування пухлинних клітин та є перспективним напрямком цільової протипухлинної терапії [43, 58, 66].

Значну увагу привертає визначення відмінностей взаємодії нормальних та пухлинних клітин з наночастинками золота, обумовлене біохімічними особливостями функціонування пухлинних клітин порівняно з нормальними клітинами [12, 26, 47, 65].

Так, на моделі пухлинних клітин лінії U937 (гістіоцитарної лімфоми людини), продемонстрована їх здатність активно акумулювати наночастинок золота усіх досліджених розмірів як на поверхні, так і всередині клітин [24].

При цьому, найбільш ефективно клітини акумулюють наночастинок золота розміром 20 і 30 нм. На рис. 13 представлені конфокально-мікроскопічні зображення пошарового сканування пухлинних клітин лінії U937 після їх взаємодії з наночастинками золота середнього розміру 30 нм, які підтверджують високий рівень акумуляції, про що свідчать зміни інтенсивності забарвлення на знімках (від червоного – максимум, до синього - мінімум).

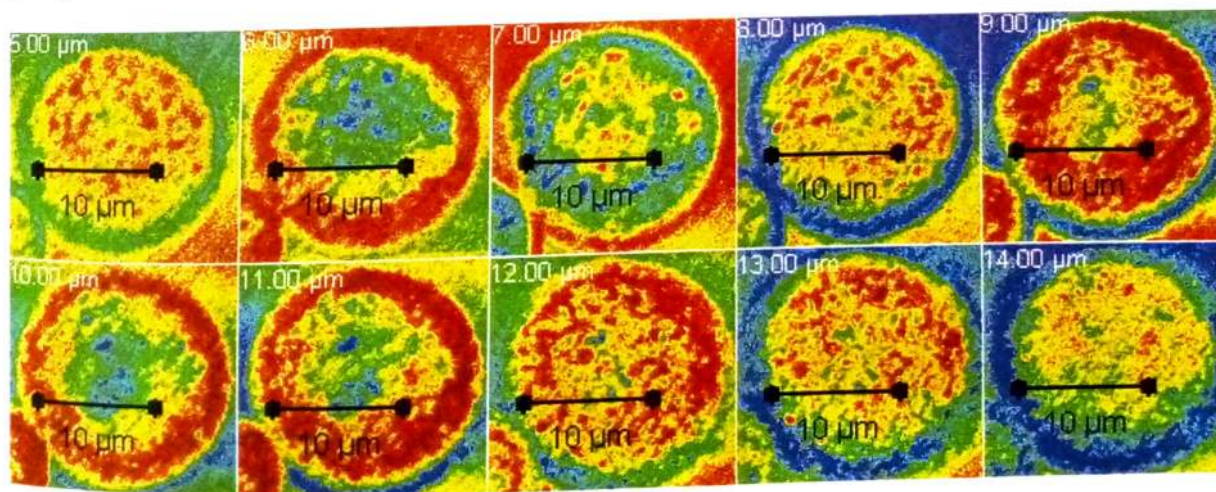


Рис. 13. Конфокально-мікроскопічне зображення пухлинних клітин лінії U937 (кінцева концентрація 10^6 клітин/мл) після інкубації з наночастинками золота розміром 30 нм протягом 3 хв у кінцевій концентрації 12,7 мкг/мл за металом. Сканування по осі z з інтервалом 1 мкм.

Експериментально встановлено [24], що взаємодія клітин лінії U937 з наночастинками золота характеризується вираженими концентраційними залежностями в діапазоні концентрацій 10^1 - 10^6 клітин/мл для наночастинок усіх вивчених розмірів.

Так, максимум зв'язування наночастинок розміром 10 і 20 нм пухлинними клітинами становить 10^3 клітин/мл (рис. 14, 15).

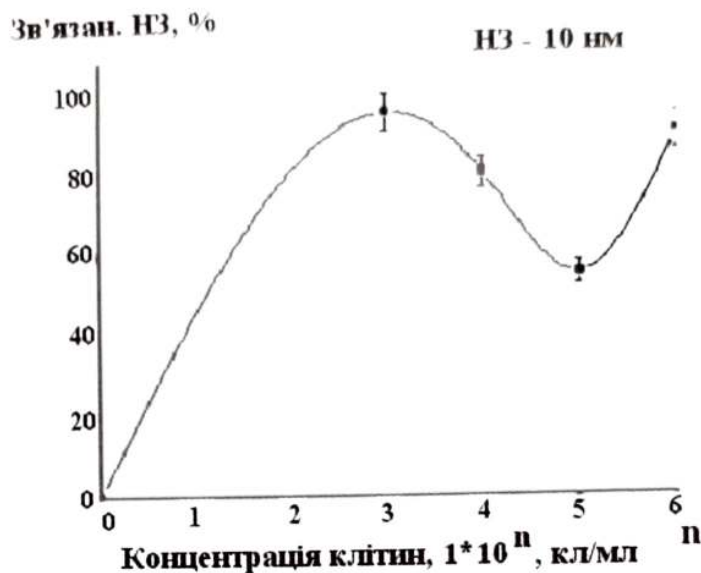


Рис. 14. Взаємодія наночастинок золота розміром 10 нм (кінцева концентрація - 12,7 мкг/мл за металом) з пухлинними клітинами лінії U937: концентраційна крива зв'язування ($M \pm m$; $n=5$; $P < 0,05$).

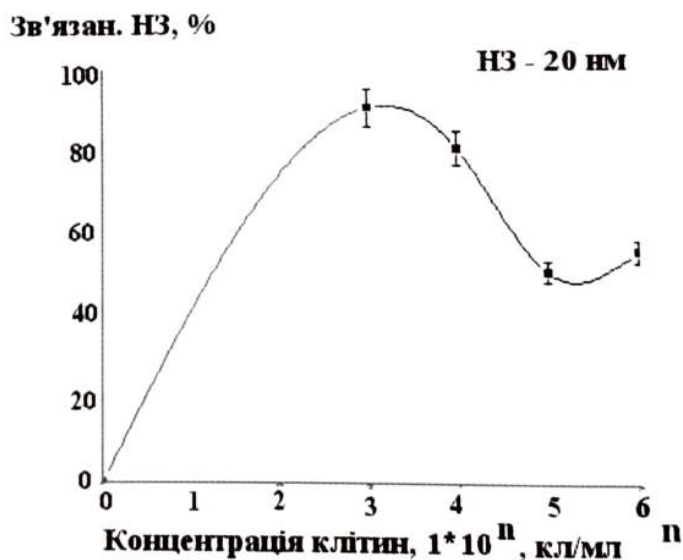


Рис. 15. Взаємодія наночастинок золота розміром 20 нм (кінцева концентрація - 12,7 мкг/мл за металом) з пухлинними клітинами лінії U937: концентраційна крива зв'язування ($M \pm m$; $n=5$; $P < 0,05$).

При цьому слід відмітити, що крива зв'язування наночастинок золота розміром 10 нм проходить через мінімум при концентрації клітин 10^5 клітин/мл, що може бути наслідком зменшення активної поверхні пухлинних клітин у результаті їх флокуляції. При цьому, подальше збільшення, на порядок, концентрації клітин призводить до підвищення акумуляції наночастинок золота до максимального рівня через збільшення площі активної поверхні. Тобто, в системі клітин з наночастинками розміром 10 нм концентрація 10^6 клітин/мл є критичною для міжклітинної взаємодії.

Концентраційна крива зв'язування наночастинок розміром 30 нм відрізняється від двох попередніх розширеним максимумом, який знаходиться у діапазоні концентрацій $10^3 - 10^5$ клітин/мл (рис. 16).

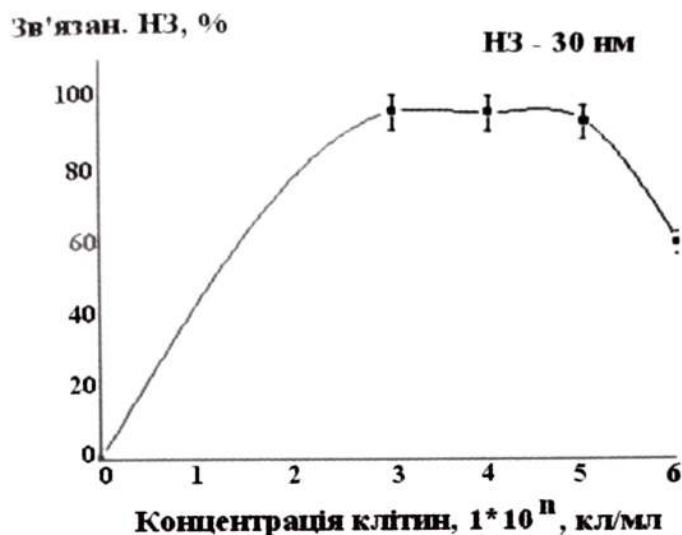


Рис. 16. Взаємодія наночастинок золота розміром 30 нм (кінцева концентрація - 12,7 мкг/мл за металом) з пухлинними клітинами лінії U937: концентраційна крива зв'язування ($M \pm m$; $n=5$; $P < 0,05$).

Що стосується наночастинок золота розміром 45 нм, то крива зв'язування практично виходить на плато в діапазоні концентрацій $10^3 - 10^6$ клітин/мл і характеризується слабо вираженим максимумом у концентрації 10^4 клітин/мл (рис. 17).

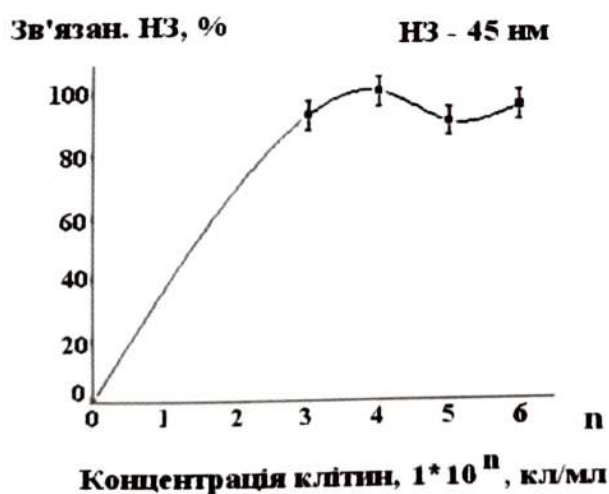


Рис. 17. Взаємодія наночастинок золота розміром 45 нм (кінцева концентрація - 12,7 мкг/мл за металом) з пухлинними клітинами лінії U937: концентраційна крива зв'язування ($M \pm m$; $n=5$; $P < 0,05$).

Зміни ефективності взаємодії пухлинних клітин з наночастинок золота найбільш ймовірно пов'язані: в області малих концентрацій клітин - із токсичним впливом наночастинок золота, в області високих концентрацій клітин - із зменшенням площі активної поверхні контакту клітин з наночастинок

в зв'язку із переважною міжклітинною взаємодією. Тобто, існують певні оптимальні співвідношення концентрацій клітин та наночастинок золота, які визначають ефективність зв'язування.

У перерахунку на одну клітину концентраційний оптимум взаємодії наночастинок золота з клітинами лінії U937 знаходиться у діапазоні $(0,1-1,0)$ нг металу для наночастинок усіх досліджених розмірів.

Вивчення кінетики цього процесу свідчить, що процес взаємодії характеризується високою швидкістю: максимум зв'язування наночастинок золота пухлинними клітинами досягається протягом 3-5 хв (рис. 18).

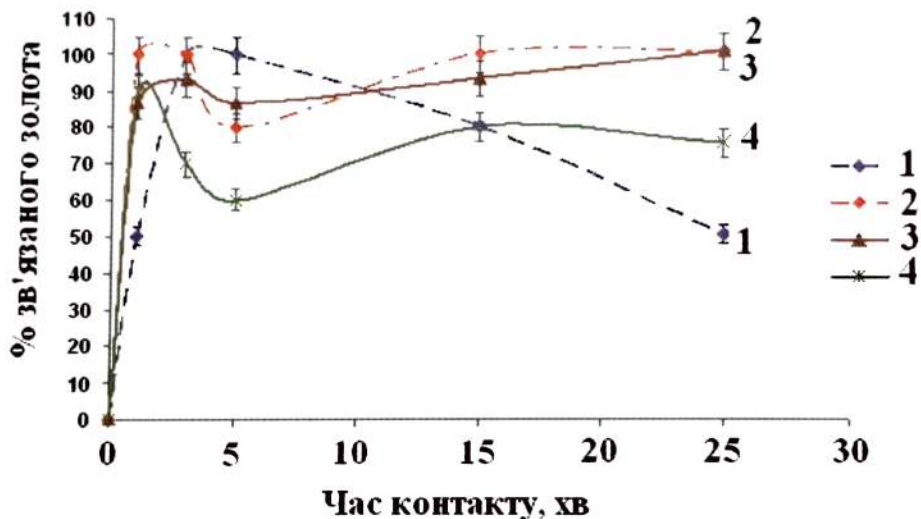


Рис. 18. Кінетика зв'язування пухлинними клітинами лінії U937 наночастинок золота розміром: 1 – 10 нм, 2 – 20 нм, 3 – 30 нм, 4 – 45 нм ($M \pm m$; $n=5$, $P < 0,05$).

Кінцева концентрація пухлинних клітин - 10^6 клітин/мл,
наночастинок золота - 12,7 мкг/мл за металом.

Слід відзначити, що для наночастинок розміром 10 нм, після досягнення максимального рівня акумуляції у пухлинних клітинах лінії U937 (гістіоцитарної лімфоми людини), має місце зворотний ефект – зменшення рівня зв'язування з часом. Це може бути обумовлено здатністю пухлинних клітин до активного «викиду» наночастинок цього розміру (рис. 18, крива 1).

Здатність пухлинних клітин до активного «викиду» токсичних для них речовин є одним з механізмів резистентності до протипухлинних препаратів. Частіш за все вона обумовлена активністю білків, які являють собою «помпи» (P-глікопротеїн (Pgp-170), MRP, LRP, VMAT, ARX), що здатні інтенсивно «викачувати» лікарські препарати з пухлинних клітин [28, 39]. Найбільш дослідженим є білок Pgp-170 та пов'язана з ним резистентність до лікарських препаратів. Pgp-170 – член суперсімейства АТР-залежних мембранних транспортних білків – є білком плазматичної мембрани. Його основна функція у організмі – захист клітин від токсичного впливу. Гіперекспресія цього білку в пухлинних клітинах призводить до зменшення внутрішньоклітинного накопичення протипухлинних препаратів внаслідок посиленого викиду лікарської речовини з клітини. Активність Pgp-170 визначає резистентність ракових клітин до багатьох протипухлинних препаратів [39].

Механізми активного «викиду» токсичних речовин, притаманні пухлинним та бактеріальним клітинам, мають ряд спільних рис, головна з яких – це вико-

ристання енергії АТФ та функціонування білків-транспортерів для активного «викиду» токсичних для клітин речовин [41].

Після потрапляння у клітину наночастинки золота, залежно від їх розміру, мають різну локалізацію.

Судячи з даних електронно-мікроскопічного аналізу можна говорити про переважне накопичення наночастинок золота розміром 10 нм та 20 нм у вакуолях (рис. 19).

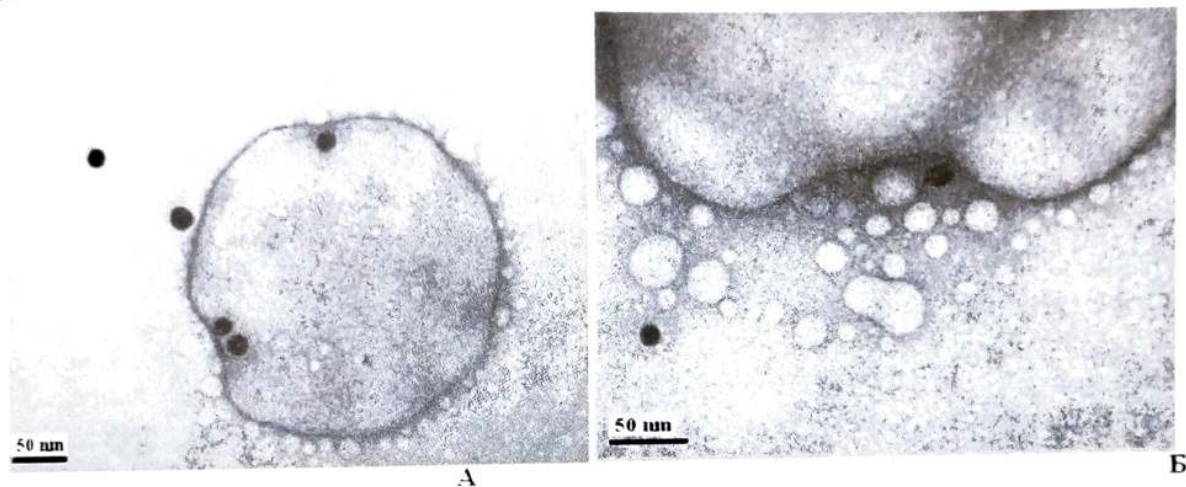


Рис. 19. Електронно-мікроскопічне зображення внутрішньоклітинної локалізації наночастинок золота розміром 20 нм (А) та 10 нм (Б) у вакуолях пухлинної клітини лінії U937. Клітини в кінцевій концентрації 10^6 клітин/мл інкубували в ФСБ-буфері протягом 3-5 хв з наночастинками золота (кінцева концентрація 12,7 мкг/мл за металом).

Як видно з рис. 19, в місцях ймовірного потрапляння наночастинок у вакуолі спостерігаються вп'ячування їх мембран, що може вказувати на проникнення наночастинок золота середнього розміру 10 і 20 нм всередину вакуолей.

Для наночастинок золота розміром 30 і 45 нм спостерігається їх переважна акумуляція лізосомами (рис. 20).

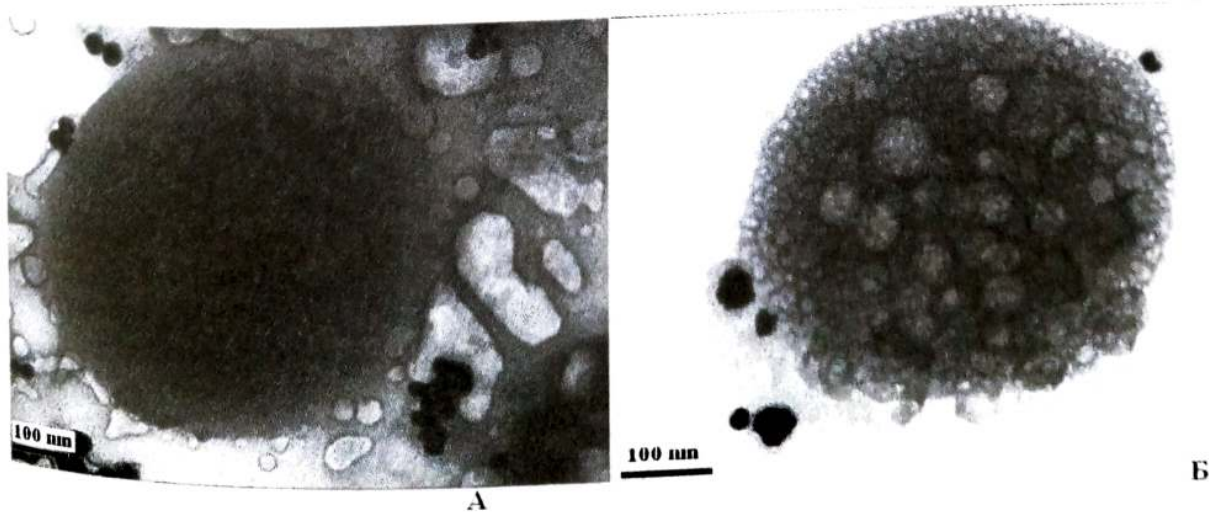


Рис. 20. Електронно-мікроскопічне зображення внутрішньоклітинної локалізації наночастинок золота розміром 30 нм у лізосомах пухлинної клітини лінії U937. Клітини в кінцевій концентрації 10^6 клітин/мл інкубували в ФСБ-буфері протягом 3-5 хв з наночастинками золота (кінцева концентрація 12,7 мкг/мл за металом).

Вплив наночастинок золота на ферментативну активність пухлинних клітин. Ферментні системи є досить чутливими біохімічними індикаторами впливу різних факторів зовнішнього середовища на клітину. Особливо це стосується мембранозв'язаних ензимів: Na^+, K^+ -АТФ-азної та Mg^{2+} -АТФ-азної активності мембранної фракції клітин лінії U937. Виражені зміни, за присутності наночастинок золота в середовищі інкубації, спостерігаються у величині Na^+, K^+ -АТФ-азної активності мембранної фракції пухлинних клітин (рис. 21, криві 1-4) [24].

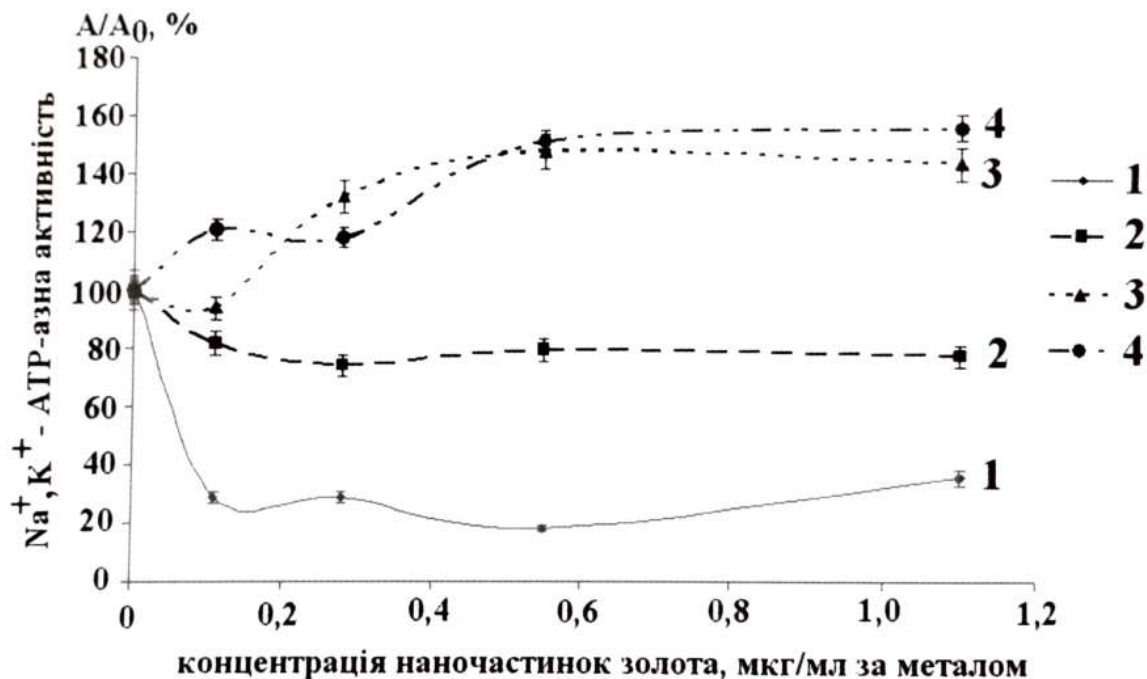


Рис. 21. Зміни величини Na^+, K^+ -АТФ-азної активності ($A/A_0, \%$) мембранної фракції пухлинних клітин лінії U937 за умов впливу наночастинок золота розміром: 1 – 10 нм, 2 – 20 нм, 3 – 30 нм, 4 – 45 нм. ($M \pm m; n=5, P < 0,05$ відносно контролю - A_0). За 100 % (контроль) прийнята величина Na^+, K^+ -АТФ-азної активності за відсутності наночастинок золота.

Так, наночастинок золота розміром 10 нм, у діапазоні концентрацій 0,11-1,1 мкг/мл, інгібують ферментативну активність на 70 %, порівняно з контролем (крива 1). Інгібування Na^+, K^+ -АТФ-азної активності, в присутності наночастинок золота розміром 20 нм, складає 20 % (крива 2). Наночастинок золота 30 нм, в діапазоні концентрацій 0,11-1,10 мкг/мл, стимулюють Na^+, K^+ -АТФ-азну активність: значення показника із підвищенням концентрації наночастинок зростає і сягає 30-40% у концентраційному діапазоні 0,28-1,10 мкг/мл (крива 3). За умов впливу наночастинок золота розміром 45 нм спостерігається підвищення Na^+, K^+ -АТФ-азної активності на 20-40% (крива 4). Так, у межах концентрацій наночастинок золота 0,11-0,28 мкг/мл за металом стимуляція Na^+, K^+ -АТФ-азної активності дорівнює 20%. У концентраційному діапазоні 0,28-0,55 мкг/мл за металом ферментативна активність зростає від 20% до 40% і становить, у середньому, 40% за концентрацій наночастинок золота 0,55-1,10 мкг/мл за металом.

Mg^{2+} -АТФ-азна активність мембранної фракції пухлинних клітин лінії U937 за умов впливу наночастинок золота середніх розмірів 10, 20, 30 і 45 нм достовірно не змінюється. Особливості впливу наночастинок золота на Na^+, K^+ -АТФ-азну

активність мембранної фракції пухлинних клітин лінії U937 можуть бути обумовлені взаємодією наночастинок певного розміру (як наслідок стеричної відповідності) з SH-групами молекули ферменту, які відповідають за його конформаційний стан.

Лактатдегідрогеназна активність цитозольної фракції пухлинних клітин лінії U937. Особливе місце в злоякісному переродженні клітини займають зміни вуглеводного обміну. Вони характеризуються аеробним гліколізом, результатом якого є розпад вуглеводів до пірувату та подальше перетворення його в молочну кислоту в присутності кисню (ефект Варбурга) [26].

На даний час аеробний гліколіз вважається найбільш загальною ознакою метаболізму пухлин [57]. За таких умов функціонування лактатдегідрогенази відіграє значну роль у забезпеченні пухлинної клітини енергією [73, 74]. Підвищення активності цього ферменту в сироватці крові багато років виступає маркером прогресування онкологічного захворювання [38]. Крім того, роль лактатдегідрогенази в енергетичному обміні еукаріотичної клітини робить цей фермент біохімічним індикатором токсичного впливу речовин, у тому числі наноматеріалів різноманітного походження [49, 59, 81]. У зв'язку з вищезазначеним, визначення особливостей впливу наночастинок золота різного розміру та концентрації на лактатдегідрогеназну активність цитозольної фракції пухлинних клітин лінії U937 являє значний теоретичний та практичний інтереси.

Експериментально встановлено [22], що при дії наночастинок золота розміром 10 нм спостерігається значна стимуляція лактатдегідрогеназної активності. Так, за концентрації наночастинок золота 0,15 мкг/мл активність цього ферменту підвищується у 4,5 рази. Рівень підвищення лактатдегідрогеназної активності в 1,5-2 рази зберігається на ділянці концентрацій 0,3-0,6 мкг/мл за металом та знову зростає до 4,5 разів у концентраційних межах 0,6-1,2 мкг/мл за металом (рис. 22, крива 1).

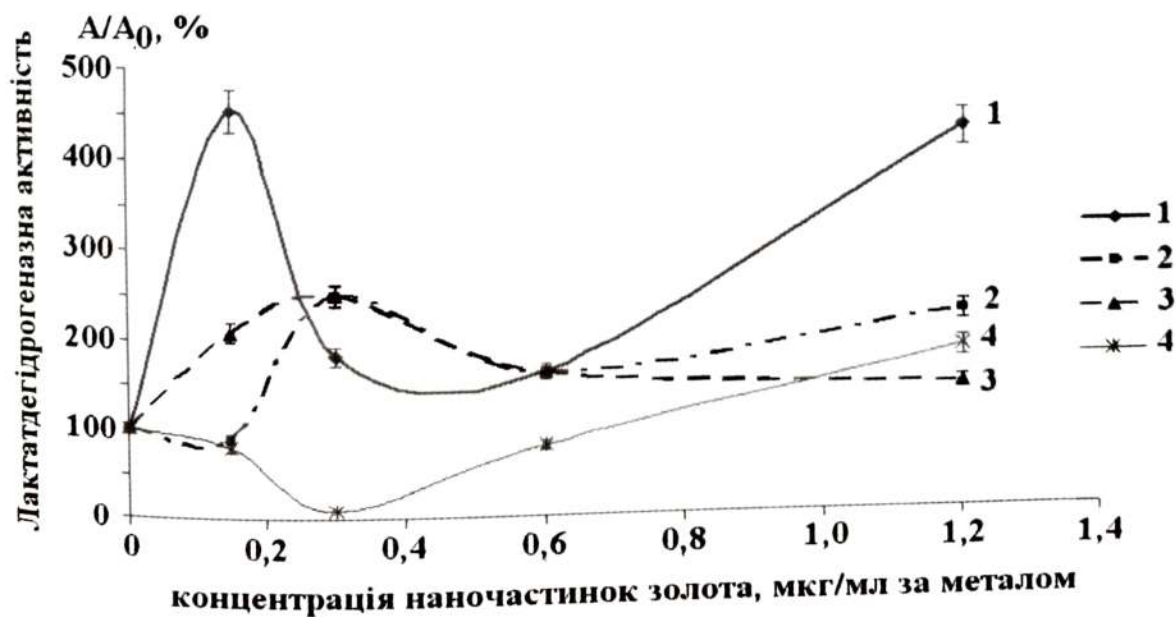


Рис. 22. Зміни величини лактатдегідрогеназної активності (A/A_0 , %) цитозольної фракції пухлинних клітин лінії U937 за умов впливу наночастинок золота розміром: 1 – 10 нм, 2 – 20 нм, 3 – 30 нм, 4 – 45 нм. ($M \pm m$; $n=5$, $P < 0,05$ відносно контролю). За 100 % (контроль) прийнята величина лактатдегідрогеназної активності за відсутності наночастинок золота.

Підвищення лактатдегідрогеназної активності, в середньому, в 1,5-2,5 рази, порівняно з контролем, спостерігається за дії наночастинок розміром 20 нм (крива 2) і 30 нм (крива 3). Наночастинки 45 нм у концентраційному діапазоні 0,15-0,6 мкг/мл за металом виявляють інгібуючий вплив на цю ферментативну активність (крива 4). Величина пригнічення зменшується з ростом концентрації наночастинок у діапазоні 0,6-1,2 мкг/мл за металом із переходом до стимуляції майже у 2 рази.

Особливості впливу наночастинок золота різного розміру на лактатдегідрогеназну активність цитозольної фракції пухлинних клітин можуть бути пов'язані з відмінностями в стеричній комплементарності при взаємодії з основними амінокислотами (аргініном та гістидином) активного центру ферменту.

Загалом слід зазначити, що за наведеними біохімічними та фізико-хімічними показниками найбільш вираженим токсичним впливом на пухлинні клітини гістіоцитарної лімфоми людини характеризуються наночастинки золота розміром 10 нм.

Наночастинки золота розміром 30 нм та 45 нм, за характером біологічної дії, є найбільш біосумісними, що вказує на перспективність їх використання як векторів цільової онкотерапії.

Вплив наночастинок золота на співвідношення білкових фракцій плазми крові щурів. Вміст білкових фракцій крові є чутливим індикатором фізіологічного стану організму людини і тварин, впливу чинників зовнішнього середовища, має велике прогностичне значення та відіграє суттєву роль у виборі максимально ефективного плану терапії [42, 77].

На сьогодні наночастинок золота приділяється значна увага в медицині у зв'язку з їх використанням у технологіях конструювання високоефективних засобів діагностики та цільової терапії, зокрема онкологічних захворювань [46, 53, 54]. Проте дані щодо особливостей впливу наночастинок золота на біохімічні процеси в органах і тканинах тварин при введенні в кров'яне русло, їх циркуляції, розподілу та елімінації, практично відсутні.

На рис. 23 наведено зміни вмісту білкових фракцій в плазмі крові щурів у нормі порівняно з контролем (тварини без ін'єкції препаратів наночастинок золота) через 1 годину після внутрішньовенного введення препаратів наночастинок золота середнього розміру 20, 30 та 45 нм.

Через 1 годину після внутрішньовенного введення препаратів наночастинок розміром 20 нм і 45 нм спостерігається незначне підвищення (на 10%) вмісту загального білку (ЗБ) в плазмі крові щурів, тоді як вплив наночастинок розміром 30 нм викликає зменшення цього показника на 10%.

Вміст альбумінів (АЛБ) у плазмі крові піддослідних тварин знижується, у середньому, на 10-15% після введення наночастинок усіх досліджених розмірів.

Зниження вмісту α_1 -глобулінів (α_1 -ГЛБ) під впливом наночастинок золота розміром 20 і 45 нм складає, у середньому, 15-20%, а наночастинок розміром 30 нм – 24%. Вміст α_2 -глобулінів (α_2 -ГЛБ) через 1 годину після введення наночастинок розміром 20 і 45 нм достовірно не змінюється, однак спостерігається збільшення цього показника на 27% за дії наночастинок розміром 30 нм. Кількість β -глобулінів (β -ГЛБ) у плазмі крові піддослідних тварин при введенні наночастинок золота розміром 20 нм достовірно не змінюється, наночастинки розміром 30 нм сприяють зниженню цього показника, в середньому, на 17%, а частинки розміром 45 нм – його підвищенню на 16%, порівняно з контролем.

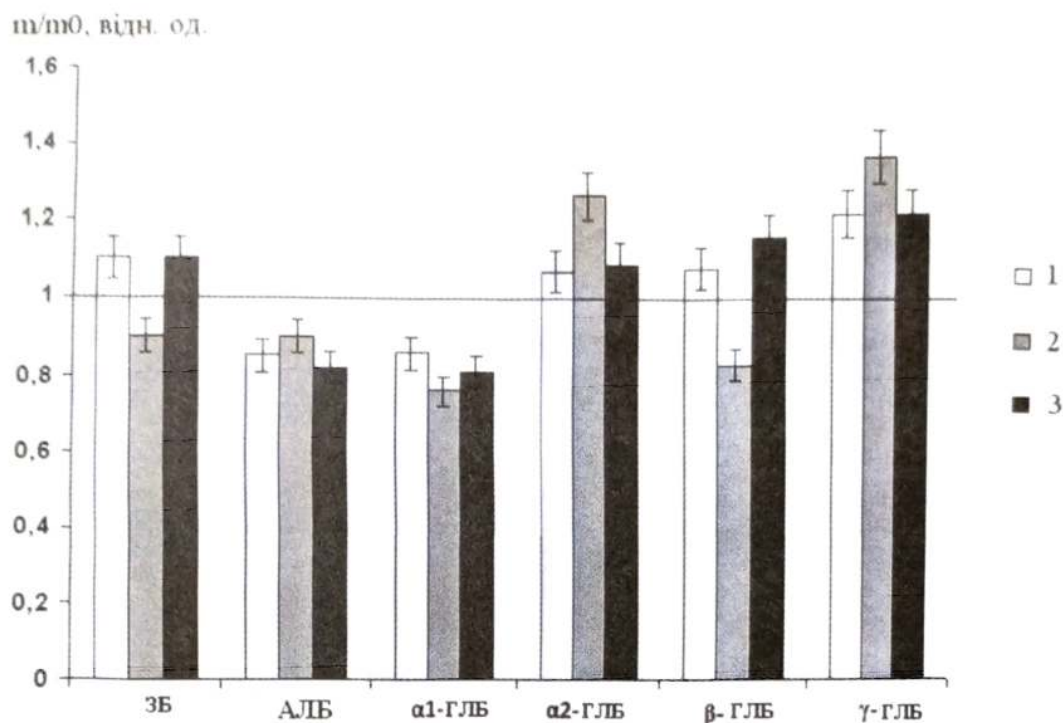


Рис. 23. Зміни вмісту білкових фракцій (m/m0, відн. од.) (ЗБ – загальний білок; АЛБ – альбумін; α₁-ГЛБ – α₁-глобуліни; α₂-ГЛБ – α₂-глобуліни; β-ГЛБ – β-глобуліни; γ-ГЛБ – γ-глобуліни) в плазмі крові щурів у нормі через 1 годину після внутрішньовенної ін'єкції 1 мл наночастинок золота розміром 20 (1), 30 (2) та 45 (3) нм. Концентрація за металом - 38,6 мкг/мл для всіх розмірів наночастинок. (M±m; n=4, P < 0,05 відносно контролю - m0). За одиницю (контроль) прийнята величина відповідних показників у плазмі крові тварин у нормі без введення наночастинок.

Найбільш виражено за умов впливу наночастинок золота змінюється вміст γ-глобулінів (γ-ГЛБ). У плазмі крові тварин через 1 годину після внутрішньовенного введення наночастинок кількість γ-ГЛБ збільшується, у середньому, на 22% за дії наночастинок розміром 20 нм і 45 нм. Вплив наночастинок розміром 30 нм викликає підвищення вмісту γ-глобулінів, у середньому, на 37%. Оскільки γ-глобулінова фракція містить антитіла, це може свідчити про напруження імунної системи організму тварин через 1 годину після ін'єкції наночастинок, яке є максимальним при введенні наночастинок золота розміром 30 нм.

Через 24 години після ін'єкції спостерігається тенденція до нормалізації вмісту білкових фракцій в плазмі крові підслідних тварин (рис. 24).

Так, за умов впливу наночастинок золота розміром 20 нм спостерігається незначне зменшення (на 10 %) вмісту білку, а значення цього показника при введенні наночастинок розміром 30 та 45 нм наближається до його значення у контролі. Вміст альбумінів підвищується, порівняно з контролем, на 24 % та 14% для наночастинок розміром 20 нм та 30 нм відповідно, а для наночастинок розміром 45 нм величина досягає контрольного рівня.

Кількість α₁-глобулінів через 24 години після введення препарату наночастинок розміром 20 нм на 12 % менша за відповідне значення кількості α₁-глобулінів у контролі. Для наночастинок розміром 30 нм зниження показника рівня α₁-глобулінів складає, у середньому, 17%, для наночастинок розміром 45 нм вміст α₁-глобулінів підвищується майже до контрольного рівня. Підвищення

вмісту α_2 -глобулінів на 23 % і 15% відповідно реєструється за умов впливу наночастинок розміром 20 нм і 30 нм, частинки розміром 45 нм на цей показник істотно не впливають. Рівень β -глобулінів у плазмі крові тварин знижується, у середньому, на 15% за умов введення наночастинок розміром 30 і 45 нм та на 24% - під впливом частинок розміром 20 нм. Вміст γ -глобулінів наближається до значення їх показника в контролі за умов впливу наночастинок золота розміром 30 і 45 нм та знижується на 9 % при дії наночастинок розміром 20 нм.

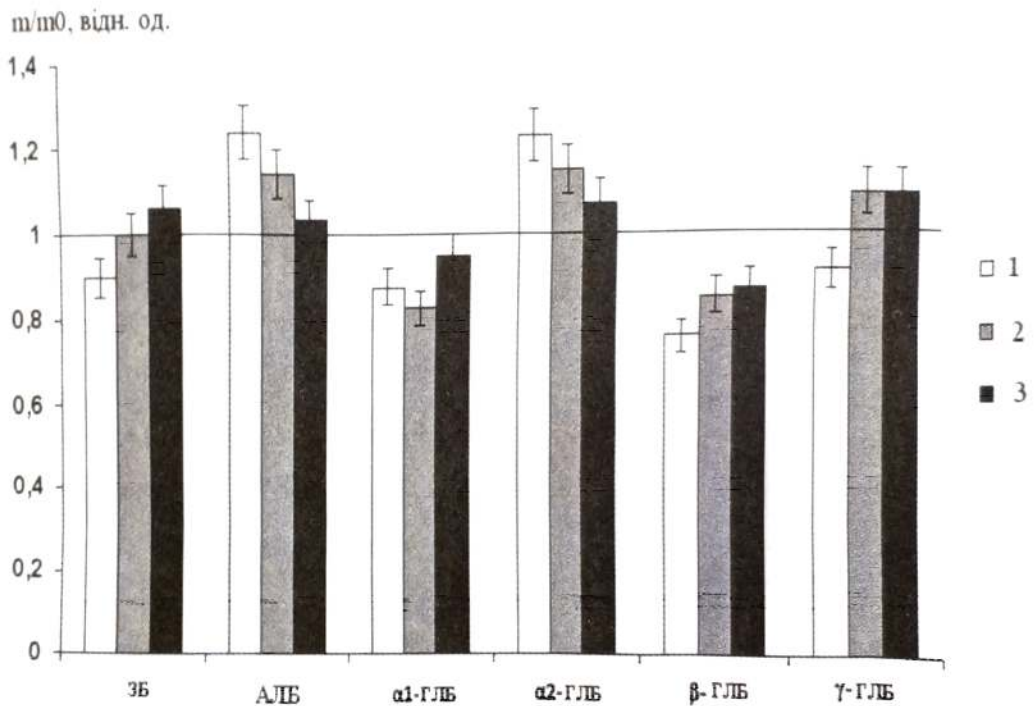


Рис. 24. Зміни вмісту білкових фракцій (m/m_0 , відн. од.) (ЗБ – загальний білок; АЛБ – альбумін; α_1 -ГЛБ – α_1 -глобуліни; α_2 -ГЛБ – α_2 -глобуліни; β -ГЛБ – β -глобуліни; γ -ГЛБ – γ -глобуліни) в плазмі крові щурів у нормі через 24 години після внутрішньовенної ін'єкції 1 мл наночастинок золота розміром 20 (1), 30 (2) та 45 (3) нм. Концентрація за металом – 38,6 мкг/мл для всіх розмірів наночастинок. ($M \pm m$; $n=4$, $P < 0,05$ відносно контролю – m_0). За одиницю (контроль) прийнята величина відповідних показників у плазмі крові тварин у нормі без введення наночастинок.

Таким чином, введення наночастинок золота тваринам у нормі не викликає виражених змін вмісту білкових фракцій крові та погіршення загального стану тварин.

Розподіл наночастинок золота в органах і тканинах щурів. Вивчення особливостей розподілу та накопичення наночастинок золота в органах і пухлинах лабораторних тварин є необхідним для оцінки перспективності використання наночастинок золота в технологіях створення засобів цільової онкотерапії. Найбільш адекватним методом оцінки розподілу та накопичення золота в органах і тканинах тварин є метод атомної абсорбції.

У таблиці 1 на прикладі наночастинок золота середнього розміру 20 нм наведено дані щодо накопичення наночастинок золота в органах і тканинах лабораторних щурів у нормі та у тварин з перещепленою карциномою Герена, резистентною до цисплатину, отримані методом атомної абсорбції.

Таблиця 1

Накопичення наночастинок золота (НЗ) розміром 20 нм у органах і тканинах піддослідних щурів з перещепленою карциномою Герена, резистентною до цисплатину (внутрішньовенне введення 1 мл препарату наночастинок у концентрації 38,6 мкг/мл).

Органи і тканини-мішені	Концентрація золота, нг Au/г тканини		
	Контрольна група	1 година після введення НЗ	24 години після введення НЗ
Пухлина	-	78,90±5,27	31,70±2,69
Тимус	-	-	-
Мозок	-	26,09±3,15	-
Легені	-	-	-
Серце	-	-	-
Надниркові залози	-	-	-
Нирки	-	51,40±6,23	-
Селезінка	-	60,00±5,78	-
Печінка	-	37,60±4,07	12,70±1,92

Примітка: “-” – вміст золота не фіксується; (M±m; n=4, P < 0,05)

Дані наведені в таблиці 1, свідчать, що в органах лабораторних щурів у нормі як через 1 годину, так і через 24 години після внутрішньовенного введення препарату наночастинок вміст золота не фіксується.

У тварин з перещепленою карциномою Герена, резистентною до цисплатину через 1 годину після ін'єкції вміст золота реєструється у наступних органах: мозку (26,09±3,15 нгAu/г тканини), нирках (51,40±6,23 нгAu/г тканини), селезінці (60,00±5,78 нг Au/г тканини) та печінці (37,60±4,07 нг Au/г тканини).

Проте через 24 години після ін'єкції, рівень накопичення наночастинок золота в печінці, селезінці та нирках істотно зменшується і складає, відповідно, 12,7±1,92 нгAu/г тканини у печінці, а у селезінці та нирках взагалі не фіксується. Це вказує на провідну роль цих органів у детоксикації та виведенні наночастинок золота з організму.

Особливої уваги заслуговує факт накопичення золота в мозку через 1 годину після введення. Це вказує на здатність наночастинок золота цього розміру долати гемато-енцефалічний бар'єр. Вільний перетин гематоенцефалічного бар'єру наночастинок золота певного розмірного діапазону свідчить про можливість та перспективність їх використання у розробці діагностиків та лікарських препаратів цільової терапії пухлин головного мозку людини, що є дуже актуальною проблемою у сучасній онкодіагностиці та онкотерапії.

Щодо пухлин, то через 1 годину після ін'єкції у них реєструється найвищий, порівняно з вмістом у органах, рівень накопичення наночастинок золота (78,90±5,27 нг Au/г тканини), який і через 24 години залишається на високому рівні та складає 31,7±2,69 нг Au/г тканини, що більш ніж у 2 рази перевищує залишкову концентрацію золота в печінці – єдиному з органів, де золото фіксується через 24 години після введення.

Таким чином, при внутрішньовенному введенні препаратів наночастинок золота тваринам у нормі відбувається швидке повне їх виведення з організму; в тварин-пухлиноносців спостерігається переважно накопичення наночастинок золота в пухлинах як через 1, так і через 24 години. Це вказує на високу афінність наночастинок золота до пухлинних клітин в організмі тварин-пухлиноносців. Така вибірковість накопичення наночастинок золота обумовлює перспективність їх використання як векторів для цільової доставки протипухлинних препаратів.

Вплив наночастинок золота різного розміру на генетичний апарат клітин *in vitro* та *in vivo*. Застосування препаратів наночастинок золота в біотехнології, медицині та фармакології у діагностичних чи терапевтичних цілях повинно бути обґрунтоване науковими доказами їх біобезпечності. Це досягається дослідженнями *in vitro* та *in vivo*, які включають оцінку дії наночастинок на клітини органів і тканин. Особливої уваги заслуговують результати щодо вивчення особливостей впливу наночастинок золота на генетичний апарат клітини.

При визначенні впливу наночастинок золота на генетичний апарат клітин для біобезпечного використання наночастинок особливого значення набуває оцінка зміни структурного стану ДНК (генотоксичності) еукаріотичних клітин різних типів [50]. Найбільш перспективним методом оцінки зміни структурного стану ДНК під впливом наночастинок є метод «ДНК-комет» (лужного гелелектрофорезу ізольованих клітин), рекомендований Європейською комісією з оцінки ризиків застосування наноматеріалів. Цей метод характеризується високою чутливістю, експресністю, високим рівнем відтворюваності результатів.

Вплив наночастинок золота на структурний стан ДНК еукаріотичних клітин лінії U937 та СНО-К1. Проникнення наночастинок золота всередину клітини є обов'язковою умовою для оцінки їх впливу на структурний стан ДНК ізольованих клітин.

На рис. 25 наведені дані, які відображають рівень ушкодження структурного стану ДНК нативних клітин лінії СНО-К1 після 30 хв інкубації з наночастинками золота за показником «% ДНК в хвості» [10].

За даними, наведеними на рис. 25, дія наночастинок розміром 10 нм викликає фрагментацію ДНК, рівень якої складає близько 15% за показником «% ДНК в хвості» (а, б). Значення цього показника значно перевищує аналогічну величину негативного контролю (1%) та наближене до величини позитивного контролю (19%). Фрагментація ДНК спостерігається і за дії наночастинок золота середнього розміру 20 нм у всіх досліджених концентраціях (в, г). Ці дані свідчать про те, що наночастинок золота розміром 10 і 20 нм, у вивчених концентраціях, здатні порушувати структурний стан ДНК клітин лінії СНО-К1.

Водночас наночастинок золота середнього розміру 30 і 45 нм не впливають на структурний стан ДНК клітин лінії СНО-К1. Величина «% ДНК в хвості» складає 1,5% (д, ж) та 1,3% (к, л) відповідно, що майже співпадає з аналогічною величиною негативного контролю.

Метаболіти, що утворюються в живому організмі як продукти біотрансформації речовин, у тому числі і наночастинок металів, також можуть пошкоджувати структурний стан ДНК. Тому для виявлення потенційної мутагенності наночастинок золота обов'язковими є дослідження з моделюванням умов живого організму, для цього застосовують ферменти печінки щурів – фракції S9 [5, 62].

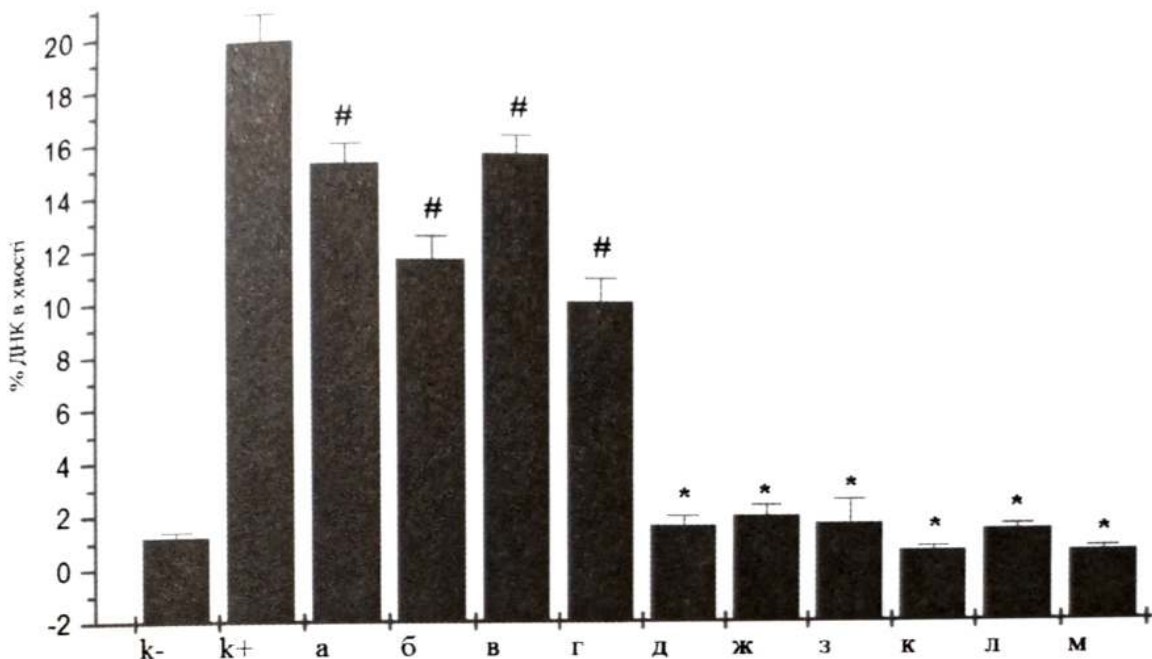


Рис. 25. Рівень ушкодження структурного стану ДНК нативних еукаріотичних клітин лінії CHO-K1 (кінцева концентрація 10^6 клітин/мл) після 30 хв інкубації з наночастинками золота: k- – негативний контроль (клітини, не оброблені наночастинками);

k+ – позитивний контроль (клітини, оброблені N-нітрозометилсечовиною); клітини оброблені наночастинками золота: а – 10 нм ($11,06 \cdot 10^{-5}$ мкг/мл); б – 10 нм ($11,06 \cdot 10^{-5}$ мкг/мл); в – 20 нм (11,0 мкг/мл); г – 20 нм ($11,0 \cdot 10^{-5}$ мкг/мл); д – 30 нм (14,0 мкг/мл); ж – 30 нм ($14,0 \cdot 10^{-5}$ мкг/мл); з – 30 нм (14,0 мкг/мл) в системі S9; к – 45 нм ($38,6 \cdot 10^{-5}$ мкг/мл); л – 45 нм ($38,6 \cdot 10^{-5}$ мкг/мл); м – 45 нм (38,6 мкг/мл за металом) в системі S9.

($M \pm m$; $n=5$; * $P < 0,05$ відносно негативного контролю – k-;

$P < 0,05$ відносно позитивного контролю – k+).

За даними рис. 25 показники, які характеризують структурний стан ДНК клітин лінії CHO-K1 за дії наночастинок золота розміром 30 та 45 нм, у присутності фракції S9 знаходяться майже на рівні негативного контролю (1%) і становлять 1,6% та 0,6% відповідно (з, м). Отже, наночастинки золота розміром 30 і 45 нм, навіть у системі з використанням метаболічної активації, не впливають на структурний стан ДНК клітин лінії CHO-K1.

Дані щодо характеру впливу наночастинок золота різного розміру на структурний стан ДНК пухлинних клітин лінії U937 є аналогічними.

На рис. 26 наведені дані щодо характеру впливу наночастинок золота розміром 10, 20, 30 та 45 нм на структурний стан ДНК клітин лінії U937. Так, наночастинки розміром 10 та 20 нм ушкоджують структурний стан ДНК клітин лінії U937: величина фрагментації ДНК за умов впливу наночастинок золота розміром 10 нм становить близько 27% за показником «% ДНК в хвості» (1, 2), що значно перевищує аналогічну величину негативного контролю та співпадає з величиною позитивного контролю. Подібна картина спостерігається і для препаратів наночастинок золота розміром 20 нм (3, 4).

Наночастинки золота середнього розміру 30 та 45 нм не впливають на структурний стан ДНК пухлинних клітин лінії U937 (величина «% ДНК в хвості» складає 3,4% (5, 6) та 2,9% (7, 8) відповідно, що майже співпадає з показником

негативного контролю). Вплив наночастинок золота на структурний стан ДНК еукаріотичних клітин обумовлений здатністю наночастинок певного розміру проникати через пори ядерної мембрани та безпосередньо взаємодіяти з молекулою ДНК.

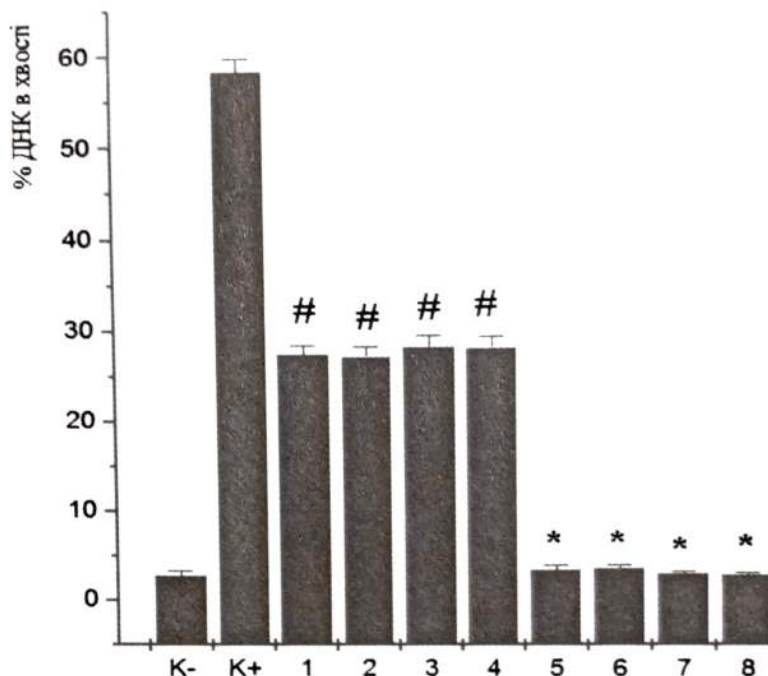


Рис. 26. Рівень ушкодження структурного стану ДНК пухлинних клітин лінії U937 (кінцева концентрація 10^6 клітин/мл) після 5 хв інкубації з наночастинками золота: K- – негативний контроль (клітини, не оброблені наночастинками); K+ – позитивний контроль (клітини, оброблені етидід бромідом); Клітини оброблені наночастинками: 1 - 10 нм ($11,06$ мкг/мл); 2 - 10 нм ($11,06 \cdot 10^{-5}$ мкг/мл); 3- 20нм ($11,0$ мкг/мл); 4 - 20нм ($11,0 \cdot 10^{-5}$ мкг/мл); 5 - 30 нм ($14,0$ мкг/мл); 6 - 30 нм ($14,0 \cdot 10^{-5}$ мкг/мл); 7 - 45 нм ($38,6$ мкг/мл); 8 - 45 нм ($38,6 \cdot 10^{-5}$ мкг/мл за металом). ($M \pm m$; $n=5$; * $P < 0,05$ відносно негативного контролю – K-; # $P < 0,05$ відносно позитивного контролю – K+).

Так, за даними Rout M. P. [69] середній розмір ядерних пор складає 20-30 нм. Тому наночастинки, розмір яких перевищує розмір пор, не здатні проникати всередину ядра та впливати на ДНК.

Окрім цього, в умовах безпосереднього впливу наночастинок золота на ДНК, велике значення мають розмір та заряд наночастинок, а також заряд молекули ДНК та гістонових білків. Розміри нуклеосом і перемичок можуть визначати стеричну комплементарність наночастинок золота та відповідних ділянок комплексу «ДНК-гістон». При цьому взаємодія може відбуватись за рахунок утворення електростатичних зв'язків негативно зарядженої наночастинок золота з позитивно зарядженими аміногрупами гістонових білків. Ці зв'язки можуть бути міцнішими порівняно із зв'язками, що стабілізують комплекс «ДНК – гістонові білки», що може призвести до дестабілізації структури ДНК та появи одно та двониткових розривів.

Таким чином, наночастинок золота середнього розміру 10 і 20 нм здатні порушувати структурний стан ДНК при взаємодії з еукаріотичними клітинами в умовах *in vitro*, що свідчить про генотоксичність наночастинок цих розмірів.

Наночастинки розміром 30 і 45 нм не впливають на структурний стан ДНК еукаріотичних клітин обох типів, що є ознакою їх біобезпечності.

Вивчення генотоксичної дії наночастинок золота різного розміру в експериментах *in vivo*. При обґрунтуванні можливості введення наночастинок золота певного розміру в кров'яне русло обов'язковим є визначення характеру їх впливу на генетичний апарат клітин – потенційних органів-мішеней.

В таблиці 2 наведені дані, які отримані методом ДНК-комет у лужних умовах щодо характеру генотоксичної дії наночастинок золота різного розміру при їх внутрішньовенному введенні лабораторним щурам [10].

Таблиця 2.

Генотоксичність наночастинок золота різного розміру в експериментах *in vivo*

Орган-мішень	«%ДНК в хвості» негативного контролю	«% ДНК в хвості» при дії наночастинок золота		
		20 нм	30 нм	45 нм
Печінка	0,3	0,4	0,4	0,3
Нирки	0,3	0,5	0,3	0,3
Кістковий мозок	1,1	1,9	1,0	1,1
Кишківник	0,7	0,9	0,8	0,8
Селезінка	0,3	21,2	0,3	0,3

Так, наночастинки золота розміром 20, 30 і 45 нм не проявляють генотоксичної дії на клітини печінки, нирок, кишківника, кісткового мозку. Показники ушкодження структурного стану ДНК («% ДНК в хвості») знаходяться на рівні аналогічного показнику негативного контролю (табл. 2).

Однак у клітинах селезінки наночастинки золота розміром 20 нм спричинюють пошкодження ДНК на рівні 21 % за показником «% ДНК в хвості» (при рівні негативного контролю 0,3 %). Електрофоретична картина, що характеризує первинні ушкодження ДНК клітин селезінки, наведена на рис. 27.



Рис. 27. Електрофоретична картина ушкодженої ДНК («ДНК-комета») клітин селезінки після внутрішньовенного введення наночастинок золота розміром 20 нм.

Наночастинки золота розмірами 30 і 45 нм не впливають на структурний стан ДНК клітин селезінки: показники «% ДНК в хвості» відповідають рівню негативного контролю.

Виходячи з вищевикладеного можна зазначити, що за характером впливу наночастинок золота різного розміру на генетичний апарат клітин *in vitro* та *in vivo* наночастинки золота розміром 30 нм є найбільш біосумісними та біобезпечними та можуть бути рекомендовані для використання в нанобіотехнології, наномедицині та нанофармакології.

Підсумовуючи дані цього розділу монографії щодо особливостей впливу наночастинок золота різного розміру на біологічні системи різного рівня організації можна зазначити, що дослідження особливостей біологічної дії наноматеріалів має особливе значення як з точки зору їх практичного застосування у нанобіотехнології, наномедицині та нанофармакології, так і оцінки рівня їх біобезпеки.

Адекватними методами визначення такого впливу можуть виступати ключові системні характеристики живого організму (фізіологічні, біохімічні, імунологічні, генетичні тощо), які є високочутливими до дії наноматеріалів, про що свідчать дані, наведені в даному розділі.

ЛІТЕРАТУРА

1. Амосова Л. А. Разработка способа получения поверхностных протективных антигенов *S. dublin* и *S. typhimurium* при помощи солянокислого гидроксилamina и мочевины для изготовления компонентов вакцины против сальмонеллеза крупного рогатого скота / Л. А. Амосова, Ю. В. Ломако, Н. В. Москалева // Весці Нац. Акад. навук Беларусі. – 2009. – № 4. – С. 86–91.
2. Богатырев В. А. Методы синтеза наночастиц с плазмонным резонансом / Богатырев В. А., Дыкман Л. А., Хлебцов Н. Г. – Саратов, 2009. – 85 с.
3. Вплив важких металів у колоїдній та іонній формах на ростові процеси *Escherichia coli* 1257 / В. В. Вембер, Т. Г. Грузіна, Т. П. Чеховська [та ін.] // Наукові Вісті НТУУ “КПІ”. – 2003. – № 6. – С. 132–137.
4. Геннис Р. Биомембраны: Молекулярная структура и функции / Р. Геннис. – М.: Мир, 1997. – 624 с.
5. Методы общей бактериологии / под ред. Ф. Герхардта. – М.: «Мир», Т. 2. – 1984. – 472 с.
6. Влияние коллоидного золота на физиолого-биохимические процессы *Escherichia coli* 1257 / Т. Г. Грузина, Т. П. Чеховская, В. В. Вембер [и др.] // Укр. біохім. журн. – 2003. – Т. 75, № 3. – С. 95–98.
7. Ідентифікація та каталітичні властивості Mg^{2+} – залежної АТФ-гідролази плазматичних мембран *Bacillus* sp B 4253, здатних до накопичення золота / Г. В. Данилович, Т. Г. Грузіна, З. Р. Ульберг [та ін.] // Укр. біохім. журн. – 2004. – Т. 76, № 5. – С. 45–51.
8. Вплив іонного та колоїдного золота на АТФ-гідролазні ферментні системи в мембрані мікроорганізмів *Bacillus* sp B4253 та *Bacillus* sp B4851 / Г. В. Данилович, Т. Г. Грузіна, З. Р. Ульберг [та ін.] // Укр. біохім. журн. – 2007. – Т. 79, № 4. – С. 46–51.
9. Аналіз генотоксичності наночастинок золота методом лужного гелевого електрофорезу ізольованих еукаріотичних клітин / С. М. Дибкова, Л. С. Резніченко, Т. Г. Грузіна [та ін.] // Доповіді НАНУ. – 2010. – №3. – С. 166–170.

10. Оцінка *in vivo* ДНК-ушкоджувальної дії наночастинок золота різного розміру / С. М. Дибкова, Л. С. Резніченко, Т. Г. Грузина [та ін.] // Біотехнологія. – 2010, Т. 3, №3. – С. 66–71.
11. 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.
12. Капля А. А. Изоферменты Na^+ , K^+ -АТФ-азы и Ca^{2+} -АТФ-азы в злокачественных новообразованиях / А. А. Капля, С. В. Хижняк, А. Г. Кудрявцева // Укр. біохім. журн. – 2006. – Т. 78, № 1. – С. 29–41.
13. Исследование роли структуры компонентов поверхности микроорганизмов в гетерокоагуляции с частицами коллоидного золота / В. И. Карамушка, З. Р. Ульберг, Т. Г. Грузина [и др.] // Прикл. Биохим. Микробиол. – 1987. – Т. 23, Вып. 5. – С. 697–702.
14. Коваленко Н. К. Скрининг штаммов молочно-кислых бактерий, обладающих гипохолестеринемической активностью, и их практическое использование / Н. К. Коваленко, С. А. Касумова, Ф. В. Мучник // Мікробіол. журн. – 2004. – Т. 66, № 3. – С. 33–42.
15. Кройт Г. Р. Коллоиды / Кройт Г. Р.; под ред. проф. В. Н. Крестинской. – Л.: Химтеорет, 1936. – 240 с.
16. Дисбактериоз кишечника (клиника, диагностика, лечение): Руководство для врачей / [Ю. В. Лобзин, В. Г. Макарова, Е. Р. Корвякова и др.]. – Спб.: Издательство ФОЛИАНТ. – 2003. – 256с.
17. Беталактамы соединения. Взаимосвязь структуры и биологической активности / П. С. Ныс, В. Б. Курочкина, А. В. Скляренко [и др.] // Антибиот. Химиотерап. – 2000. – № 11. – С. 36–42.
18. Роль биохимических факторов в селективной гетерокоагуляции микроорганизмов с частицами коллоидного золота / Ф. Д. Овчаренко, З. Р. Ульберг, В. И. Карамушка [и др.] // ДАН СССР. – 1986. – Т. 287, № 4. – С. 1009–1012.
19. Біохімічні механізми селективності взаємодії мікроорганізмів з металами / Ф. Д. Овчаренко, З. Р. Ульберг, М. В. Перцов [та ін.] // Вісник АН УРСР. – 1988. – №2. – С. 11–21.
20. Петров Ю. И. Кластеры и малые частицы / Ю. И. Петров. – М.: Наука, 1982. – 360 с.
21. Рапопорт А. И. Структурно-функциональные перестройки в клетках при обезвоживании-регидратации / А. И. Рапопорт, Э. Ю. Вентыня // Торможение жизнедеятельности клеток. – Рига: Знатнее, 1987. – С. 85–119.
22. Резніченко Л. С. Біохімічні ефекти впливу наночастинок золота на прокаріотичні та еукаріотичні клітини / дис. на здобуття ступ. канд. біол. наук. – Київ, 2010. – 148 с.
23. Вплив металів-мікроелементів на функціональний стан бактерій-пробіонтів / Л. С. Резніченко, Т. Г. Грузина, В. В. Вембер [та ін.] // Укр. біохім. журн. – 2008. – Т. 80, № 1. – С. 96–101.
24. Контактна взаємодія наночастинок золота з пухлинними клітинами: вплив розміру та концентрації / Л. С. Резніченко, С. І. Шпильова, Т. Г. Грузина [та ін.] // Доповіді НАНУ. – 2010. – №2. – С. 170–174.

25. Вплив наночастинок золота та срібла на АТР-азну активність нативних і регідратованих клітин *Escherichia coli* / М. Є. Романько, Л. С. Резніченко, Т. Г. Грузина [та ін.] // Укр. біохім. журн. – 2009. Т. 81, №6. – С. 70–76.
26. Сейц И. Ф. Молекулярная онкология: (Руководство для врачей) / И. Ф. Сейц, П. Г. Князев. – Л.: «Медицина», 1986. – 352 с.
27. Сидоренко С. В. Бета-лактамазы расширенного спектра: клиническое значение и методы детекции / С. В. Сидоренко // Инф. Антимикроб. Терап. – 2002. – Т. 4, № 6. – С. 1–14.
28. Ставровска А. А. Клеточные механизмы множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток / А. А. Ставровска // Биохимия. – 2000 – № 65, Вып. 1 – С. 112–126.
29. Стейниер Р. Мир микробов / Стейниер Р., Эдельберг Э., Ингрэм Дж. – М.: Мир, Т. 2. – 1979. – 334 с.
30. Сумм Б. Д. Коллоидно-химические аспекты нанохимии – от Фарадея до Пригожина / Б. Д. Сумм, Н. И. Иванова // Вест. Моск. Ун-та. Сер. 2. химия. – 2001. – Т. 42, № 5. – С. 300–305.
31. Ульберг З. Р. Нанотехнології в медицині: роль колоїдно-хімічних процесів / З. Р. Ульберг, Т. Г. Грузина, О. В. Карпов // Вісник НАНУ. – 2008. – № 8. – С. 28–41.
32. Ульберг З. Р. Определение локализации и выделения фактора, связывающего коллоидные частицы золота / З. Р. Ульберг, В. И. Карамушка, Т. Г. Грузина // Биотехнология. – 1986. – № 1. – С. 109–115.
33. Влияние протонаторов на гетерокоагуляцию бактериальных клеток и минеральных частиц / З. Р. Ульберг, В. И. Карамушка, Т. Г. Грузина [и др.] // Коллоидн. журн. – 1990. – Т. 52, №1. – С. 172–175.
34. Коллоидно-химический механизм связывания металлов микроорганизмами / З. Р. Ульберг, Т. А. Полищук, Л. Г. Марочко [и др.] // Коллоидн. журн. – 1994. – Т. 58, №4. – С. 584–588.
35. Харчук И. А. Анабиоз: основные понятия и сопровождающие его процессы / И. А. Харчук // Экология моря. – 2005. – Вып. 70. – С. 62–78.
36. Чекман І. С. Наночастинки: властивості та перспективи застосування / І. С. Чекман // Укр. біохім. журн. – 2009. – Т. 81, № 1. – С. 122–129.
37. Шарон Н. Стенка бактериальной клетки / Н. Шарон // Молекулы и клетки. – 1970. – Вып. 5. – С. 106–117.
38. Активность лактатдегидрогеназы при раке молочной железы / О. П. Шатова, Б. Г. Борзенко, Д. А. Хилько [и др.] // Питання експериментальної та клінічної медицини. – 2008. – Т. 1, Вып. 12. – С. 197–203.
39. Действие липосомального доксорубина на клетки линии, экспрессирующие активный PGP170 / И. Б. Шоуа, А. П. Полозкова, Н. А. Оборотова [и др.] // Рос. Биотерапевт. Журн. – 2004. – Т. 3, №1. – С. 20–23.
40. Коллоидно-химические основы наноауки / под. ред. А. П. Шпака. З. Р. Ульберг. – К.: Академперіодика, 2005. – 466 с.
41. Янева О. Д. Механизмы устойчивости бактерий к ионам тяжелых металлов / О. Д. Янева // Мікробіол. журн. – 2009. – Т. 71, № 6. – С. 54–65.

42. *Al-Joudi F. S.* Prognostic value of an index for serum globulin compensation in colon and breast cancers / F. S. Al-Joudi // Singapore Med. J. – 2005. – Vol. 46, № 12. – P. 710–713.
43. Gold nanoparticles designed for combining dual modality imaging and radiotherapy / C. Alric, R. Serduc, C. Mandon [et al.] // Gold Bulletin. – 2008. – Vol. 41, № 2. – P. 90–97.
44. Novel one-step synthesis of amin-stabilized aqueous colloidal gold nanoparticles / M. Aslam, L. Fu, M. Su [et al.] // J. Mater. Chem. – 2004. – № 14. – P. 1795–1797.
45. Application of gold nanoparticles in cancer nanotechnology / W. Cai, T. Gao, H. Hong [et al.] // J. Nanotech. Sci. Appl. – 2008. – № 1. – P. 17–32.
46. Colloidal gold nanoparticles as a blood-pool contrast agent for x-ray computed tomography in mice / Q. Y. Cai, S. H. Kim, K. S. Choi [et al.] // Invest. Radiol. – 2007. – Vol. 42, № 12. – P. 797–806.
47. Role of DNA hypomethylation in the development of the resistance to doxorubicin in human MCF-7 breast adenocarcinoma cells / V. F. Chekhun, G. I. Kulik, O. V. Yurchenko [at al.] // Cancer Lett. – 2006. – Vol. 231, № 1. – P. 87–93.
48. *Chen Po. C.* Gold nanoparticles: from nanomedicine to nanosensing / Po. C. Chen, S. C. Mwakwari, A. K. Oyelere // J. Nanotech. Sci. Appl. – 2008. – № 1. – P. 45–66.
49. *Decker T.* A quik and simple methods for quantitation of lactate dehydrogenase release in measurement of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity / T. Decker, M. L. Lohmann-Matther // J. Immunol. Methods. – 1998. – № 15. – P. 61–67.
50. *Methods in Molecular Biology. In Situ Detection of DNA Damage. Methods and protocols.* / Edited by V. Didenko. – Humana Press, 2002. – 279 p.
51. *El-Sayed I. H.* Surface plasmon resonance scattering and absorption of anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles in cancer diagnostics: applications in oral cancer / I. H. El-Sayed, X. Huang, M. A. El-Sayed // Nano Lett. – 2005. – № 5. – P. 829–834.
52. *Fei L.* Effect of nanoparticles on protein folding and fibrillogenesis / L. Fei, Sarah Perrett // Int. J. Mol.Sci. – 2009. – № 10. – P. 646–655.
53. Hetero-bifunctional poly(ethylene glycol) modified gold nanoparticles as an intracellular tracking and delivery agent / W. Fu, D. Shenoy, J. Li [et al.] // NSTI-Nanotech. – 2005. – Vol. 1. – 324–327.
54. Gold nanoparticles: a new X-ray contrast agent / J. F. Hainfeld, D. N. Slatkin, T. M. Focella [et al.] // Br. J. Radiol. – 2006. – № 79. – P. 248–253.
55. Characterization of nanoparticles for therapeutics / J. B. Hall, M. A. Dobrovolskaia, A. K. Patri [et al.] // Nanomedicine. – 2007. – Vol. 2, № 6. – P. 789–803.
56. *Hoppe J.* The proton conducting F₀-part of bacterial ATP synthases / J. Hoppe, W. Sebald // Biochem. Biophys. Acta. – 1984. – № 768. – P. 1–27.
57. *Hsu P. P.* Cancer cell metabolism / P. P. Hsu, D. M. Sabatini // Cell. – 2008. – № 5. – P. 703–707.

58. Cancer cell imaging and photothermal therapy in the near-infrared region by using gold nanorods / X. Huang, I. H. El-Sayed, W. Qian [et al.] // *J. Am. Chem. Soc.* – 2006. – No.128. – P. 2115–2120.
59. *Jurisc V.* In vitro assays for cell death determination / V. Jurisc // *Arch Oncol.* – 2008. – Vol. 16, № 3–4. – P. 49–54.
60. Immunotargeted nanoshells for integrated cancer imaging and therapy / C. Loo, A. Lowery, N. Halas [et al.] // *Nano Lett.* – 2005. – Vol. 5, № 4. – P. 709–711.
61. *Lugtenberg C.* Molecular architecture and functioning of the outer membrane of *Escherichia coli* and other gram-negative bacteria / C. Lugtenberg, L. Alphen // *Biochem. Biophys. Acta.* – 1983. – Vol. 733, № 1. – P. 51–115.
62. *Maron D. M.* Revised methods for the Salmonella mutagenicity test / D. M. Maron, B. N. Ames // *Mutat. Res.* – 1983. – Vol. 113. – P. 173–215.
63. *Merroun M. L.* Interactions between metals and bacteria: fundamental and applied research / M. L. Merroun // *FORMATEX.* – 2007. – P. 108–119.
64. Electrochemical immunosensor based on polythionine/gold nanoparticles for the detection of aflatoxin B1 / J. Owino, O. A. Arotiba, N. Hendricks [et al.] // *Sensors.* – 2008. – № 8. – P. 8262–8274.
65. Colloidal gold: novel nanoparticle vector for tumor directed drug delivery / G. F. Paciotti, L. Myer, D. Weinreich [et al.] // *Drug Deliv.* – 2004. – Vol. 11, № 3. – P. 169–183.
66. *Pissuwan D.* Therapeutic possibilities of plasmonically heated gold nanoparticles / D. Pissuwan, S. M. Valenzuela, M. B. Cortie // *Trends Biotechnol.* – 2006. – Vol. 24, № 2. – P. 62–67.
67. Synthesis and bioconjugation of gold nanoparticles as potential molecular probes for light-based imaging techniques / R. G. Rayavarapu, W. Petersen, C. Ungureanu [et al.] // *Int. J. Biomed. Imaging.* – 2007. – Vol. 2007, Article ID 29817. – 10 p.
68. *Reznichenko L. S.* The peculiarities of proteins interaction with gold and silver nanoparticles of different sizes / L. S. Reznichenko, T. G. Gruzina, Z. R. Ulberg // *Abstracts of Ukrainian-German Symposium on Physics and Chemistry of Nanostructures and on Nanobiotechnology (September 6–10, 2010, Beregove The Crimea, Ukraine).* – P. 219.
69. *Rout M. P.* The nuclear pore complex as a transport machine / M. P. Rout, J. D. Aitchison // *J. Biol. Chem.* – 2001. – Vol. 276, № 20. – P. 16593–16596.
70. *Samarasinghe S. R.* Synthesis, processing and forming gold structures from 0,1 wt. % concentration solution / S. R. Samarasinghe, M. J. Edirisinghe // *Gold Bulletin.* – 2008. – Vol. 41, № 4. – P. 284–295.
71. Size controlled synthesis of gold nanoparticles using photochemically prepared seed particles / T. K. Sau, A. Pal, N. R. Jana [et al.] // *J. Nanopart. Res.* – 2001. – № 3. – P. 257–261.
72. *Schneider E.* All three subunits are required for the reconstitution of an active proton channel (F_0) of *Escherichia coli* ATP synthase (F_1F_0) / E. Schneider, K. Altendorf // *The EMBO Journal.* – 1985. – № 4. – P. 515–518.

73. *Semenza G. L.* Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxiz-inducible factor 1 / G. L. Semenza // *J. Biol. Chem.* – 1996. – № 271. – P. 32529–32537.
74. *Semenza G. L.* Tumor metabolism: cancer cells give and take lactate / G. L. Semenza // *J. Clin. Invest.* – 2008. – Vol. 118, № 12. – P. 3835–3837.
75. Inhibition of Cytochrome P450 Enzymes by metallic nanoparticles: a preliminary to nanogenomics / A. Sereemasapun, P. Hongpiticharoen, R. Royanathanes [et al.] // *Int. J. Pharm.* – 2008. – Vol. 4, № 6. – P. 492–495.
76. *Thomas M.* Conjugation to gold nanoparticles enhances polyethylenimine's transfer of plasmid DNA into mammalian cells / M. Thomas, M. Klibanov // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2003. – Vol. 100, № 16. – P. 9138–9143.
77. *Topuria I.* Statistical analysis of some biochemical parameters of aggressive non-hodgkin lymphomas / I. Topuria // *Ann. Biomed. Res. Educ.* – 2002. – Vol. 2, № 1. – P. 84–86.
78. *Ulberg Z. R.* Interaction of energized bacteria cells with particles of colloidal gold: peculiarities of the process / Z. R. Ulberg, A. S. Dukhin, V. I. Karamushka // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1992. – Vol. 1134 – P. 89–95.
79. *Ulberg Z. R.* ATP – Dependent gold accumulation by living chlorella cells / Z. R. Ulberg, V. I. Karamushka, A. S. Dukhin // *Acta Biotech.* – 1991. – Vol. 11, № 3 – P. 197–203.
80. *Vlerken L. E.* Multi-functional polymeric nanoparticles for tumor-targeted drug delivery / L. E. Vlerken, M. M. Amiji // *Expert. Opin. Drug Deliv.* – 2006. – Vol. 3, № 2. – P. 205–216.
81. *Weyermann J.* A practical note on the use of cytotoxicity assays / J. Weyermann, D. Lochmann, A. Zimmer // *Int. J. Pharm.* – 2005. – № 288. – P. 369–376.
82. *Whyman R.* Gold nanoparticles a renaissance in gold chemistry / R. Whyman // *Gold Bulletin.* – 1996. – Vol. 29, № 1. – P. 11–15.
83. *Zhang Y. X.* Mesoscale spherical and planar organizations of gold nanoparticles / Y. X. Zhang, H. C. Zeng // *Funct. Mater. Lett.* – 2008. – Vol. 1, № 1. – P. 43–53.