

Т.Г. Грузіна, Л.С. Рєзніченко, Л.М. Якубенко, В.І. Подольська,
Н.І. Грищенко, З.Р. Ульберг, С.М. Дибкова

ДОСЛІДЖЕННЯ ТОКСИЧНОЇ ДІЇ НАНОЧАСТИНОК МІДІ: ВПЛИВ НА ЕЛЕКТРОПОВЕРХНЕВІ ТА БІОХІМІЧНІ ПОКАЗНИКИ БАКТЕРІАЛЬНИХ КЛІТИН

Інститут біологічної хімії ім. Ф.Д. Овчаренка Національної академії наук України
бул. Академіка Вернадського, 42, Київ, 03680, Україна, E-mail: gruzinatamara@gmail.com

Дане дослідження спрямовано на вивчення електроповерхневих і біохімічних показників бактеріальних клітин *B.cereus* B4368, *L.plantarum*, *E.coli* K-А, *P.fluorescens* B5040 при дії міді в іонній і колоїдній формі з метою встановлення природи та рівня їхнього токсичного впливу на бактерії. Використано наночастинки міді, синтезовані у водному розчині за допомогою NaBH_4 і стабілізовані декстраном. Зміни в показниках мембранного транспорту оцінювали за величиною АТФазної активності; зміни трансмембранного потенціалу оцінювали методом проникаючих катіонів тетрафенілфосфонію (TPP^+); порушення цілісності бактерії оцінювали методом спектроскопії клітинних метаболітів в УФ-діапазоні. Встановлено концентраційно-залежне пригнічення мембранної АТФазної реакції і дисипацію трансмембранного потенціалу під дією обох форм міді, причому у випадку наночастинок інгібуючий вплив виявився в середньому на 20 % вищим порівняно з іонною формою. В результаті гетерокоагуляції стабілізованих декстраном наночастинок міді і бактерій відмічене зменшення значень негативного ζ - потенціалу бактерій, яке під дією наночастинок міді було на 40 % ефективніше, порівняно з іонами Cu^{2+} . Найбільш суттєві зміни мембранних показників спостерігалися в інтервалі концентрації міді 10–60 мкМ. На прикладі клітин *B. cereus* B4368 встановлено порушення бар'єрної функції їхньої клітинної оболонки під впливом обох препаратів міді. У випадку наночастинок міді зафіксований витік нуклеїнових кислот із цитоплазми бактерій, що підтверджено смугою поглинання при 260 нм. Отримані результати свідчать про високий рівень чутливості досліджених електроповерхневих та біохімічних параметрів бактеріальних клітин до впливу іонів та наночастинок міді, що дозволяє використовувати їх як індикатори токсичності наночастинок металів при розробці металовмісних пробіотичних препаратів.

Ключові слова: наночастинки міді, бактерії, електрокінетичний потенціал, трансмембранний потенціал, АТФазна активність, цілісність клітин

ВСТУП

Неможливість широкого впровадження препаратів нанометалів у медичну практику на сьогоднішній день пов'язана в першу чергу з відсутністю системних методів контролю їхньої безпечності. Останнім часом у зв'язку з вирішенням багатьох практичних задач у сфері використання наночастинок металів (НЧ Me) гостро постає проблема розробки певного переліку методів оцінки їхньої можливої токсичної дії [1–3]. Одна з головних перешкод для просування лікарських препаратів НЧ Me є відсутність гармонізованих і стандартизованих характеристик НЧ та методів оцінки їх ризику [4]. Встановлення рівня біологічного впливу НЧ Me на живі організми слугує запорукою їхнього безпечного використання. Особливу увагу серед тестових біологічних систем слід

приділяти бактеріальним клітинам, оскільки акумуляція та перерозподіл металів між внутрішньоклітинним та зовнішнім середовищем є природним процесом життєдіяльності мікробної клітини. Бактерії, як правило, є першими організмами, які відчувають вплив важких металів у довкіллі [5, 6].

Колоїдно-хімічний процес взаємодії бактеріальних клітин та металів може бути охарактеризований як електрохімічними, так і біохімічними параметрами, оскільки кінцевий результат взаємодії та впливу НЧ Me на бактеріальну клітину буде залежати як від її інтегральних електроповерхневих властивостей, так і від структурної та функціональної гетерогенності поверхні клітини [2, 4]. Остання обумовлена в першу чергу особливостями функціонування

мембрано-зв'язаних ферментних систем, що регулюють транспорт заряджених речовин через плазматичну мембрану [7, 5].

Добре відомо, що мідь є важливим елементом у житті ссавців. Вона є учасником важливих біохімічних процесів організму людини, входячи до складу ферментів як кофактор [8]. Нанорозмірна форма цього металу є досить перспективною для створення лікарських засобів нового покоління. НЧ міді певного розміру та концентраційного діапазону здатні проявляти як стимулюючу, так і інгібуючу біологічну активність [9, 10]. Вивільнення іонів міді, наприклад, може посилити та підтримувати регенерацію тканин. Разом з тим, НЧ міді можуть накопичуватися в організмі або вивільняти занадто багато іонів, викликаючи довгострокову токсичність або сприяючи розвитку пов'язаних з накопиченням міді захворювань [11, 12], тобто існує нагальна потреба в розробці нових інструментів для оцінки токсичності НЧ металів та вивчення її механізмів.

Нанопрепарати міді знаходять застосування при створенні антисептичних засобів [13]. НЧ міді викликають окиснювальний стрес, руйнування вірусів або бактеріальних мембран [14, 15]. Головним фактором, що визначає токсичність НЧ металів для бактерій, ймовірно, є їхня здатність проникати у цитоплазму.

Дослідження впливу НЧ міді на функціональний стан і електроповерхневі показники бактеріальних клітин дає можливість контролювати та регулювати інтенсивність їхніх фізіолого-біохімічних реакцій, що може бути використано при створенні металовмісних пробіотичних препаратів та вакцин для профілактики і лікування різноманітних захворювань людини та тварин. Зважаючи на вище сказане, метою роботи було вивчення потенційних індикаторів токсичності – електрохімічних та біохімічних параметрів бактеріальних клітин у відповідь на дію НЧ міді, в порівнянні з їхньою іонною формою.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

Використані бактеріальні клітини штамів *Bacillus cereus* B4368, *Escherichia coli* K-A, *Pseudomonas fluorescens* B5040 із колекції Інституту біологічної хімії ім. Ф.Д. Овчаренка

НАН України. Культуру лактобактерій *Lactobacillus plantarum* виділено з препарату «Флактонія» (Біофарма, Україна). Культивування бактерій *B.cereus* B4368, *E.coli* K-A, *P.fluorescens* B5040 здійснювали в колбах на качалках з аерацією при 28 °С в середовищі наступного складу в перерахунку на 1 л: триптон – 10 г, дріжджовий екстракт – 5 г, глюкоза – 1 г, цистеїн – 30 мг, рН = 7.0. Для вирощування *L.plantarum* використане модифіковане середовище MPC (de Mann, Rogosa, Sharpe) [16] наступного складу у перерахунку на 1 л: автолізат кормових дріжджів – 30.0 г, глюкоза – 20.0 г, панкреатичний гідролізат казеїну – 10.0 г, сульфат мангану – 0.2 г, сульфат магнію – 0.1 г, фосфат калію двозаміщений – 2.0 г, ацетат натрію – 2.0 г, цитрат амонію – 1.0 г, рН = 6.4. Після 25 год культивування (стаціонарна фаза росту) біомасу клітин переосажували центрифугуванням при 3700 g у відповідних середовищах для вимірювань.

Формування наночастинок міді проводили шляхом відновлення міді в 0.05 М $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ за допомогою NaBH_4 (~ 98 %, Sigma-Aldrich, США) у пропорції 1:2. Як стабілізуючий агент використано Декстран з MW 30000 (Sigma-Aldrich, США). Спектр поглинання водної суспензій НЧ міді реєстрували у видимій області за допомогою спектрофотометра СФ-46 (ЛОМО, Росія).

Електричні властивості поверхні клітин оцінювали, вимірюючи електрофоретичну рухливість бактерій методом мікроелектрофорезу в комірниці закритого типу. Електрокінетичний потенціал (ζ -потенціал) розраховували за формулою Смолуховського [17]. Препарати НЧ міді та її іонні аналоги вносили в бактеріальну дисперсію безпосередньо перед вимірюванням ζ -потенціалу і витримували 30 хв.

Питому АТФазну активність препаратів плазматичних мембран реєстрували за швидкістю накопичення неорганічного фосфату (P_i), концентрацію якого в середовищі визначали методом Фіске-Суббароу [18] та оцінювали у відносних величинах A/A_0 , де A_0 – швидкість АТФазної реакції інтактних плазматичних мембран, а A – цей же показник для модифікованих препаратів. Середовище визначення АТФазної активності містило: 10 мМ *tris-*

HCl, 3 mM MgCl₂, 3 mM АТР, рН 7.5. Плазматичні мембрани із оброблених препаратами міді клітин бактерій отримували та аналізували згідно [19].

Трансмісний потенціал бактерій вимірювали методом проникаючих іонів [20] в середовищі наступного складу: 10 mM трис-HCl, 1 % глюкози, рН 7.5. Як проникаючий катіон використовували тетрафенілфосфоній (TRP⁺), концентрацію якого в середовищі визначали селективним електродом. Результати вимірювань представляли у відносних величинах m/m_0 , де m_0 і m – кількість TRP⁺, яка поглинута інтактними та модифікованими металом клітинами, відповідно. Ця величина пропорційна величині трансмісний потенціалу згідно рівняння Нернста.

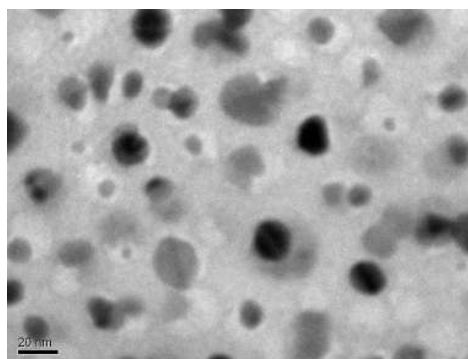
Зміну рівнів проникності бактеріальних клітин оцінювали за наявністю в середовищі внутрішньоклітинних метаболітів, які здатні поглинати в УФ-світлі при $\lambda = 200\text{--}340$ нм (білкова фракція) [21]. Біомасу бактерій пересаджували в дистильованій воді та інкубували 5 год в присутності відповідної форми металу. Інкубаційні суспензії клітин фільтрували через фільтри МФА-А № 2 з

діаметром пор до 0.6 мкм (НПО «Тасма») і аналізували на спектрофотометрі СФ-46, кювета 1 см [19].

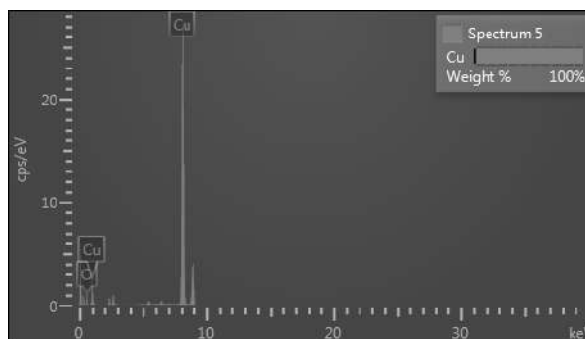
Електронно-мікроскопічні дослідження НЧ міді проводили із застосуванням трансмісійного мікроскопа JEM-1230 (JEOL LTD, Японія). Рентгеноструктурний мікроаналіз хімічного складу НЧ міді виконано методом енергодисперсійної рентгенівської спектроскопії EDXS на спектрометрі IETEM 250 з детектором X-Max 80 (Oxford Instruments Analytical, Великобританія). Дослідження синтезованих НЧ міді проведено в Центрі колективного користування електронними мікроскопами НАН України при Інституті ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Природа токсичної дії важких металів на бактерії є досить складною і розглядати цей процес необхідно з урахуванням широкого спектра фізико-хімічних факторів зовнішнього середовища, а також індивідуальних властивостей виду бактерій. Рівень токсичності в значній мірі залежить також від форми металу [10].



а



б

Рис. 1. ТЕМ-зображення синтезованих НЧ міді (а). EDXS наночастинок міді, синтезованих методом хімічної конденсації у водному розчині (б)

В роботі використано НЧ міді, синтезовані шляхом відновлення у водному середовищі іонів міді за допомогою NaBH₄ і стабілізовані природним полісахаридом декстраном. Водна дисперсія НЧ мала золотисто-рожевий колір. Згідно аналізу електронно-трансмісійного зображення, наведеного на рис. 1 а, середній розмір частинок становив 20 нм, форма частинок – переважно сферична. Наведений на рис. 1 б рентгеноструктурний мікроаналіз

хімічного складу досліджених наноструктур не виявив у їхньому складі оксидів та гідроксидів міді, що вказує на наявність нуль-валентної міді. Формування НЧ міді також підтверджує наведений на рис. 2 спектр поглинання водної дисперсії НЧ у видимій області. Для сферичних наночастинок міді характерною є смуга поверхневого плазмонного резонансу в діапазоні 570–580 нм.

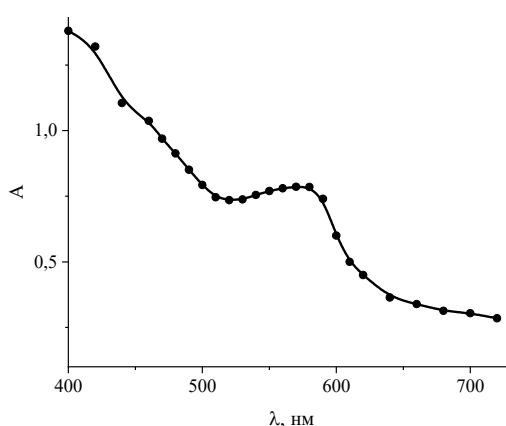


Рис. 2. Спектр поглинання водної дисперсії наночастинок міді

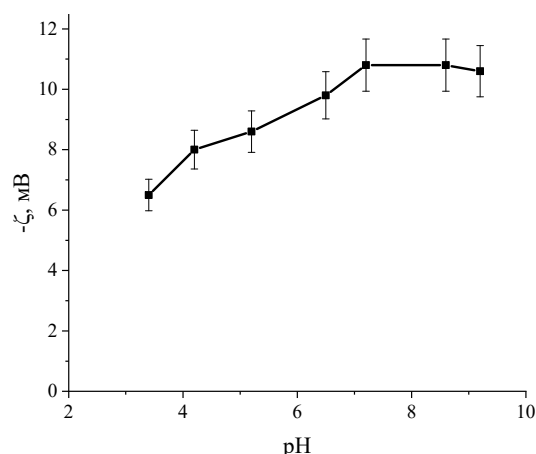


Рис. 3. Вплив рН середовища на величину зета-потенціалу НЧ міді

Дослідження показали, що синтезовані НЧ міді мали невисокі значення зета-потенціалу в широкому діапазоні значень рН середовища. Дані наведені на рис. 3. Для стабілізації було використано природний водорозчинний полісахарид декстран, який складається з глюкозопіранових кілець, з'єднаних атомами кисню. Це речовина, яка містить певну кількість вільних гідроксильних груп. Завдяки їм НЧ мають невисокий негативний зета-потенціал в фізіологічному інтервалі, який мало залежить від величини рН. З переходом в кисле середовище можливий частковий гідроліз молекул декстрану з утворенням олігосахаридів і порушенням структури захисного шару, що супроводжується зменшенням електрокінетичного потенціалу НЧ міді, вкритих шаром декстрану. Також слід взяти до уваги суттєве підвищення розчинності НЧ міді та сполук з виділенням катіонів міді при переході в кисле середовище, що встановлено в роботах [11, 22]. Згідно [11], при $\text{pH} \geq 5$ розчинялося більше 95 % НЧ CuO .

Розглянуті дві групи взаємозв'язаних результатів: зміни електрокінетичного потенціалу та зміни біохімічних параметрів бактерій під впливом міді в іонній формі та НЧ.

Взаємодія металів з бактеріальними клітинами в першу чергу відображається на зміні їхніх електростатичних властивостей. Структурні компоненти клітинних оболонок (білки, ліпіди, вуглеводи) здатні зв'язувати метал як в іонній формі, так і НЧ, що супроводжується зміною величини

негативного заряду бактеріальної поверхні. Характер зміни величини електрокінетичного потенціалу (ζ - потенціалу) бактерій після контакту з препаратами міді може відображати ефективність такої взаємодії.

Наведені на рис. 4 дані ілюструють вплив НЧ міді та її іонної форми на ζ - потенціал бактерій чотирьох видів, які належать до 2-х морфологічних груп. Бактерії *E.coli* K-A і *P.fluorescens* B5040 належать до групи грамнегативних бактерій, які характеризуються наявністю двох мембран і вкриті шаром ліпополісахариду. Бактерії *L.plantarum* і *B.cereus* B4368 належать до групи грампозитивних бактерій, які характеризуються товстою пептидоглікановою клітинною стінкою. Значення ζ - потенціалу необроблених клітин *L.plantarum*, *B.cereus* B4368, *E.coli* K-A, *P.fluorescens* B5040 становлять -23.3, -28, -42.7, -46.6 мВ, відповідно. Як видно, загалом $\Gamma(+)$ бацили мають нижчий зета-потенціал порівняно з $\Gamma(-)$ кишковою паличкою і псевдомонадою. Проте за характером концентраційного впливу іонної міді на величину заряду поверхні вони однотипні. Збільшення концентрації Cu^{2+} -іонів на два порядки супроводжувалося зменшенням негативного ζ - потенціалу на 5–9 мВ (рис. 4 а). Що стосується взаємодії клітин з НЧ міді (рис. 4 б), тут спостерігаються деякі відмінності. По-перше, в інтервалі концентрацій Cu НЧ 0.02–2 мкМ бацили демонструють невелике зростання негативного заряду, хоча при цьому сама величина - ζ залишається меншою, ніж при

контакти з іонами міді. По-друге, Г(-) бактерії *E.coli* К-А і *P.fluorescens* В5040 демонструють зростання зета-потенціалу в інтервалі ще

менших концентрацій 0.02–0.11 мкМ з подальшим поступовим зниженням на 12–20 мВ при більших концентраціях НЧ міді.

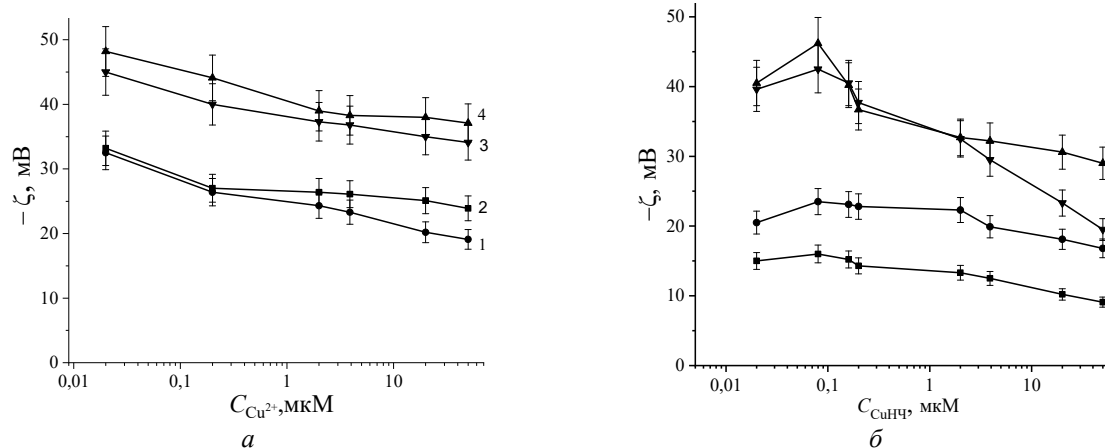


Рис. 4. Залежність ζ - потенціалу культур *B.cereus* В4368 (1), *L.plantarum* (2), *E.coli* К-А (3), *P.fluorescens* В5040 (4) від логарифму концентрації іонів Cu^{2+} в середовищі інкубування (а) та від логарифму концентрації наночастинок міді (за металом) (б)

Розглянемо уважніше вплив концентрації обох форм міді на електрокінетичний потенціал і біохімічні параметри на прикладі бактерії *B.cereus* В4368.

На рис. 5 наведено концентраційну залежність нормованих значень ζ - потенціалу бактерій з міддю відносно необроблених клітин. При збільшенні концентрації відмічене зниження значень негативного ζ - потенціалу, яке у випадку контакту з НЧ Cu було на 40 % ефективніше, ніж при контакті з іонами Cu^{2+} . Нагадаємо, що в кислому і близькому до нейтрального інтервалі рН 3.4÷7.2 НЧ міді несли невеликий негативний заряд -6.5÷-10.5 мВ (рис. 3). Тобто клітини *B.cereus* В4368 і НЧ міді мали однойменні заряди. За умов експерименту клітини витримували в середовищі з препаратами міді впродовж 30 хв. Можна обґрунтовано припустити, що зниження негативного заряду бацил відбулося не в результаті електростатичної взаємодії, а шляхом гетерокоагуляції НЧ міді стабілізованих декстраном з бактеріальними клітинами, що привело до зміщення площини ковзання подвійного електричного шару біля поверхні клітин вглиб середовища і, як результат, до зменшення їх ζ - потенціалу. Проте немонотонний характер концентраційної залежності в присутності

НЧ, на відміну від монотонного зниження в присутності іонів, вказує на наявність додаткових факторів, які його спричинили. Враховуючи особливість взаємодії живих і неживих колоїдних систем, можна припустити, що при інкубуванні відбувалася також фізіологічна реакція клітини, пов'язана зі зміною її фізіолого-біохімічних показників, на що вказується в [7, 8]. При малих концентраціях міді можливе стимулювання, при великих – пригнічення або загибель клітини.

Розглянемо реакцію основних біохімічних показників бактерій *B.cereus* В4368 на інкубування з препаратами міді. Були вибрані АТФаза активність, величина трансмембранного потенціалу та рівень проникності клітинної оболонки.

Токсична дія важких металів обумовлена в багатьох випадках їхнім концентраційно-залежним впливом на ферментні системи бактерій, в першу чергу мембраноз'язані [5, 8]. Мембранна АТФаза та трансмембранний потенціал є тими параметрами, які характеризують біоенергетичні властивості бактеріальних клітин. Головним генератором трансмембранного потенціалу є мембранна АТФаза, яка згідно отриманих раніше нами і іншими авторами даних [6, 23], виявилася досить чутливим індикатором токсичності

деяких важких металів. Проведені експерименти показали, що мідь як в іонній формі, так і НЧ у вивчених концентраціях дозозалежно пригнічувала АТФазну активність плазматичних мембран *B.cereus* B4368. Відповідні дані наведені на рис. 6, криві 1, 2. Рівень інгібування АТФазної реакції A/A_0 виявився в середньому на 20 % вищим для НЧ міді (крива 1), ніж цей показник для іонної форми (крива 2).

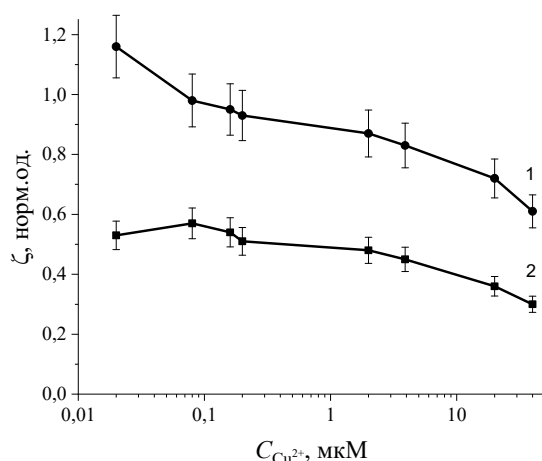


Рис. 5. Вплив міді в іонній формі (1) та НЧ (2) на величину електрокінетичного потенціалу (ζ) бактерій *B.cereus* B4368 в залежності від логарифму концентрації міді. Величина ζ - потенціалу нормована відносно показника для необроблених клітин

При дослідженні впливу міді в обох вивчених формах на величину трансмембранного потенціалу бактеріальних клітин були виявлені наступні особливості. Як видно з рис. 6, спостерігалось монотонне зниження ефективності поглинання TRP^+ з ростом концентрації як НЧ, так і іонів міді (рис. 6, криві 3 і 4, відповідно). Причому, як і у випадку з АТФазною активністю, значно більш токсичну дію мали НЧ міді (крива 3). Рівень дисипації трансмембранного потенціалу, який пропорційний до ефективності поглинання проникаючих іонів m/m_0 , при дії НЧ міді, складав близько 52 % проти 35 % у випадку її іонної форми, причому найбільш значні зміни мембранних показників спостерігаються в інтервалі концентрацій 10–60 мкМ. При збільшенні концентрації міді в обох її формах залежність майже виходить на плато.

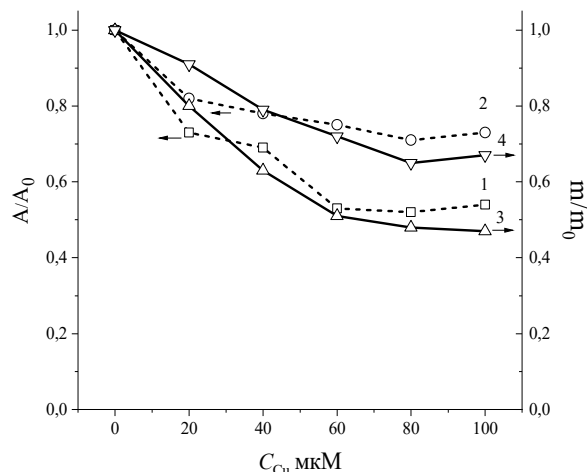


Рис. 6. Вплив НЧ міді (1, 3) та іонів Cu^{2+} (2, 4) на АТФ-азну активність (A/A_0) плазматичних мембран (1, 2) та величину трансмембранного потенціалу (m/m_0) клітин *B.cereus* B4368 (3, 4)

Відомо, що необхідною умовою підтримання фізіологічного рівня величини трансмембранного потенціалу бактеріальної клітини є цілісність плазматичної мембрани. В багатьох випадках важкі метали спричиняють порушення бар'єрних функцій плазматичної мембрани бактеріальної клітини, що відображається на величині електрокінетичного потенціалу клітинної поверхні [6]. Метали можуть взаємодіяти з фосфоліпідами плазматичних мембран бактерій, викликаючи структурування ліпідної маси. Це призводить до підвищення температури фазового переходу та стабілізації структури [5]. Але присутність металу з одного боку мембрани стабілізує лише контактний моношар. Тому об'єм, який займають молекули зовнішнього шару, під дією металу буде зменшуватися, тоді як об'єм молекул внутрішнього шару залишається незмінним. В такому випадку неминуче виникає механічна напруга, яка призводить до появи дефектів та порушень бар'єрних властивостей мембрани. Ймовірно, що плазматична мембрана бактерій під дією НЧ міді відчуває додатковий деструктивний вплив, окрім зміни основної біохімічної структури формування трансмембранного потенціалу.

Виходячи із отриманих даних, можна очікувати, що токсичний вплив міді, спільно з дією на біохімічні структури, пов'язаний також і з порушенням бар'єрної функції бактеріальної

плазматичної мембрани. З метою перевірки такого припущення були виконані експерименти по вивченню рівня клітинної проникності бактерій. Концентрація іонів і НЧ міді (в перерахунку на метал) при інкубуванні складала відповідно 50 мкМ. На рис. 7 наведено спектр поглинання метаболітів в діапазоні довжин хвиль 220–340 нм.

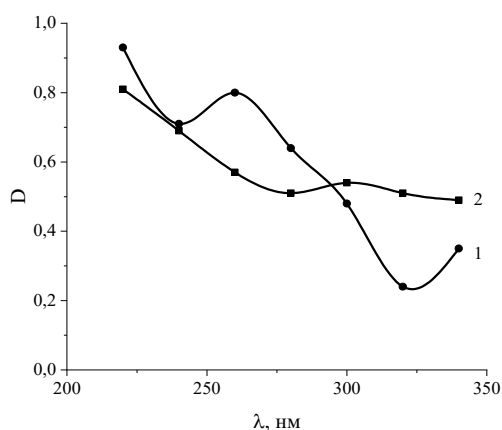


Рис. 7. Вплив НЧ міді (1) та іонів Cu^{2+} (2) на вміст внутрішньоклітинних метаболітів клітин *B.cereus* V4368 після їхнього інкубування з відповідними препаратами

Видно, що в присутності обох форм міді відбувалася зміна бар'єрних характеристик мікробних клітин, яка супроводжувалася витоком внутрішньоклітинних метаболітів. При цьому рівень проникності під дією НЧ міді (крива 1) перевищував цей показник у випадку іонної міді (крива 2), що особливо показово в області 240–280 нм. В цій області і в більш короткохвильовій розміщені смуги поглинання аліфатичних бокових ланцюжків амінокислотних залишків [21]. Азотисті сполуки (та відповідні нуклеотиди), що входять до складу нуклеїнових кислот ДНК і РНК, мають властивості поглинати ультрафіолетове світло при 260 нм. Крім того, при порушенні високопорядкованої двоспиральної конформації азотистими основами спостерігається гіперхромний ефект, тобто зростання поглинання розчинів молекул ДНК при 260 нм. Отже, в випадку НЧ міді токсичний ефект, ймовірно, пов'язаний з пошкодженням компонентів цитоплазми. У випадку іонів міді (крива 2) спостерігається смуга поглинання з максимумом при 280 нм, що визначається наявністю ароматичних амінокислот – фенілаланіну, тирозину, триптофану з препаратами міді.

Як співвідносяться одержані результати з такими показниками токсичності, як мінімальна інгібуюча концентрація (МІК), максимальна бактерицидна концентрація (МБК), зона пригнічення росту? Треба відмітити, що в багатьох роботах, присвячених антимікробним властивостям НЧ міді і її похідних, ці показники значно відрізняються в залежності від розміру, складу захисної оболонки, складу композиту, методів вимірювання, фізико-хімічних умов інкубування, особливо величини рН. Так, в роботі [24] зроблено спробу врахувати вплив розміру (20, 40 і 80 нм) і концентрації (1 мкМ, 10 мкМ, 100 мкМ, 1 мМ і 10 мМ) НЧ Cu на антимікробну активність *in vivo* при лікуванні ран. Загалом результати не показали жодної визначеної тенденції. Однак НЧ меншого розміру виявились цитотоксичними при всіх концентраціях для ендотеліальних клітин, при цьому вони не впливали на життєздатність клітин фібробластів і кератиноцитів. Визначені в роботі [22] для біогенних НЧ CuO розміром 30–75 нм показники МІК та МБК щодо *S.aureus* були однаковими і становили 0,25 мг/мл. Для *P.aeruginosa* МІК становила 0,50 мг/мл, МБК – 0,25 мг/мл. Композит НЧ міді з хітозаном в тестах з пригнічення зони росту *S.aureus* та *E.coli* продемонстрував антимікробну активність при концентраціях 800–400 мкг/мл [25]. Подібні тести з гідрогелевим нанокмполитом на основі крохмалю, наповненого вкритими кремнієм НЧ міді, продемонстрували антибактеріальний ефект в діапазоні концентрацій НЧ міді 0,36–1,27 ммоль/г гелю [26]. В роботі [27] автори встановили, що гетеротрофна активність природної популяції зменшується при додаванні 10 мкг/л іонів міді та 50 мкг/л іонів ртуті, але кількість життєздатних гетеротрофних бактерій при цьому залишалася незмінною.

Досліджені нами концентраційні діапазони нетоксичної дії досліджуваних НЧ міді узгоджуються з даними щодо токсичності НЧ Me по відношенню до еукаріотричних клітин та лабораторних тварин. Так, у дослідженнях генотоксичності *in vitro* з використанням різних ліній культур еукаріотичних клітин (U937, CHO-K1, HEp-2, L929, ПТП) методом ДНК-комет в лужних умовах продемонстровано відсутність генотоксичної дії досліджених НЧ міді у

концентраційному діапазоні 2.7–8 мг/мл за металом [28]. При дослідженні гострої токсичності досліджуваних в даній роботі НЧ міді виявлено, що водні дисперсії таких НЧ Ме належать до IV класу токсичності (малотоксичні речовини). LD50 (напів-летальна доза) при внутрішньовенному введенні мишам становила 460.8 ± 38.9 мг/кг, а при внутрішньошлунковому – 1947.0 ± 160.5 мг/кг [29]. Було показано, що НЧ міді у дозі 6.4 мг/кг при внутрішньовенному введенні мишам не змінювали активність ферментів АлАТ (аланінаміно-трансфераза), АсАТ (аспартатамінотрансфераза), а також вміст загального білірубину та креатиніну в сироватці крові, що вказує на безпечність досліджуваних НЧ за даними параметрами. Не виявлено негативного впливу НЧ міді у діапазоні доз 4–40 мг/кг на діяльність серця та гемодинаміку кролів при внутрішньовенному введенні [30].

Як видно з наведених даних, токсичність міді проявляється в широкому діапазоні концентрацій. Тобто є концентраційний інтервал, коли НЧ суттєво впливають на фізіологічні або біохімічні показники бактерій. Проте при цьому токсичність може мало відобразитися на їхньому рості. Дослідження електроповерхневих і біохімічних параметрів дають додаткову

інформацію, що дозволяє прогнозувати необхідний склад і концентрацію нанопрепарату.

ВИСНОВКИ

Показано, що токсична дія НЧ та іонної форми міді проявляється концентраційно-залежним впливом на ферментні системи бактерій, в першу чергу - мембранозв'язані. На прикладі бактерій *B.cereus* B4368 встановлено, що в концентраційному діапазоні 10–100 мкМ токсичний вплив НЧ міді на мембранний транспорт, який пов'язаний з АТФазною активністю, та трансмембранний потенціал є найбільш вираженим. Підтверджено, що вплив іонної форми і особливо НЧ міді приводить до порушення цілісності клітинної оболонки і виходу внутрішньоклітинної білкової фракції. Досліджені зміни біохімічних показників добре корелюють із впливом вивчених форм міді на електрокінетичний потенціал клітин бактерій. Одержані дані свідчать про інформативність дослідження електрохімічних та біохімічних параметрів бактеріальних клітин для оцінки токсичності НЧ міді і перспективність їх використання для проектування більш безпечних НЧ і їх подальшого біомедичного застосування.

Research of toxic behavior of copper nanoparticles: effect on electrosurface and biochemical parameters of bacterial cells

T.G. Gruzina, L.S. Rieznichenko, L.M. Yakubenko, V.I. Podolska, N.I. Grishchenko,
Z.R. Ulberg, S.M. Dybkova

F.D. Ovcharenko Institute of Biocolloidal Chemistry of National Academy of Science of Ukraine
42 Academician Vernadsky Blvd., Kyiv, 03680, Ukraine, gruzinatamara@gmail.com

*This research is aimed at the investigation the electrosurface and biochemical parameters of bacterial cells *B. cereus* B4368, *L. plantarum*, *E. coli* K-A, *P. fluorescens* B5040 under the influence of copper in ionic form and as nanoparticles in order to determine the nature and level of their toxic effect on bacteria. Copper nanoparticles synthesized in aqueous solution with NaBH_4 and stabilized with dextran were used. Changes in membrane transport parameters were assessed by the value of ATPase activity; changes in transmembrane potential were assessed by the method of penetrating tetraphenylphosphonium cations (TPP^+); and bacterial integrity was assessed by UV spectroscopy of cellular metabolites. A concentration-dependent inhibition of the membrane ATPase reaction and dissipation of the transmembrane potential under the action of both forms of copper was found, and the inhibitory effect in the case of the nanoparticles was on average 20 % higher than in the ionic form. As a result of heterocoagulation of dextran-stabilized copper nanoparticles and bacteria, a decrease in the negative ζ -potential of bacteria was observed, which was 40 % more effective under the action of copper nanoparticles compared to Cu^{2+} ions. The most significant changes in membrane parameters were observed in the range 10–60 μM of copper*

concentrations. With *B. cereus* B4368 cells taken as an example, we found a violation of the barrier function of their cell membrane under the influence of both copper preparations. In the case of copper nanoparticles, nucleic acid leakage from the bacterial cytoplasm was detected, which was confirmed by the absorption band at 260 nm. The results obtained indicate a high level of sensitivity of the studied electro-surface and biochemical parameters of bacterial cells to the effects of ionic and nanoparticle copper, which allows them to be used as indicators of the toxicity of metal nanoparticles in the development of metal-containing probiotic preparations.

Keywords: copper nanoparticles, bacteria, electrokinetic potential, transmembrane potential, ATPase activity, cell integrity

ЛІТЕРАТУРА

1. Zhang N., Xiong G., Liu Z. Toxicity of metal-based nanoparticles: challenges in the nano era // *Front. Bioeng. Biotechnol.* – 2022. – V. 10. – P. 1001572.
2. Mu Y., Wu F., Zhao Q. et al. Predicting toxic potencies of metal oxide nanoparticles by means of nano-QSARs // *Nanotoxicology.* – 2016. – V. 10, N 9. – P. 1207–1214.
3. Cao Y., Li S., Chen J. Modeling better in vitro models for the prediction of nanoparticle toxicity: a review // *Toxicol. Mech. Methods.* – 2021. – V. 31, N 1. – P. 1–17.
4. Yang W., Wan L., Mettenbrin E.M. et al. Nanoparticle toxicology // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* – 2021. – V. 61. – P. 269–289.
5. Ульберг З.Р., Грузіна Т.Г., Перцов Н.В. Коллоидно-хімічні властивості біологічних наносистем. Біомембрани // Коллоидно-хімічні основи нанонауки. – Київ: Академперіодика, 2005. – С. 199–237.
6. Aljerf L., AlMasri N.A. Gateway to metal resistance: bacterial response to heavy metal toxicity in the biological environment // *Annals of Advances in Chemistry.* – 2018. – V. 2, N 1. – P. 032–044.
7. Alberts B., Johnson A., Lewis J. et al. *Molecular biology of the cell.* 4th edn. – New York: Garland Science, 2002. – 1616 p.
8. Bradberry S.M. Metals (cobalt, copper, lead, mercury) // *Medicine.* – 2016. – V. 44, N 3. – P. 182–184.
9. Чекман І.С., Ульберг З.Р., Маланчук В.О. та ін. Нанонаука, нанобіологія, нанофармація. – Київ: Поліграф плюс, 2012. – 328 с.
10. Ermini M.L., Voliani V. Antimicrobial nano-agents: the copper age. Review // *ACS Nano.* – 2021. – V. 15, N 4. – P. 6008–6029.
11. Studer A.M., Limbach L.K., Van Duc L. et al. Nanoparticle cytotoxicity depends on intracellular solubility: comparison of stabilized copper metal and degradable copper oxide nanoparticle // *Toxicol. Lett.* – 2010. – V. 197, N 3. – P. 169–174.
12. Nikolova M.P., Chavali M.S. Metal oxide nanoparticles as biomedical materials // *Biomimetics.* – 2020. – V. 5, N 2. – P. 27–74.
13. Zhou Y., Wei F., Zhang W. et al. Copper bioaccumulation and biokinetic modeling in marine herbivorous fish *Siganus oramin* // *Aquat. Toxicol.* – 2018 – V. 196. – P. 61–69.
14. Ahamed M., Alhadlaq H.A., Majeed Khan M.A., Karuppiyah P. Synthesis, characterization, and antimicrobial activity of copper oxide nanoparticles // *J. Nanomaterials.* – 2014. – V. 3. – P. 1–4.
15. Rubilar O., Rai M., Tortella G. et al. Biogenic nanoparticles: copper, copper oxides, copper sulphides, complex copper nanostructures and their applications // *Biotechnol. Lett.* – 2013. – V. 35, N 9. – P. 1365–137.
16. De Man J.C., Rogosa M., Sharpe M.E. A medium for the cultivation of lactobacilli // *J. Appl. Bacteriol.* – 1960. – V. 23, N 1. – P. 130–13.
17. Духин С.С., Дерягин Б.В. Электрофорез. – Москва: Наука, 1976. – 328 с.
18. Компанець І.В. Методичні рекомендації до спецкурсу і спецпрактикуму. Визначення структури та функцій біологічних мембран / Електронний посібник www.biol.univ.ua. – 2013. – 45 с.
19. Остапченко Л.І., Михайлик І.В. Біологічні мембрани: методи дослідження структури та функцій: Навчальний посібник. – Київ: Видавничо-поліграфічний центр «Київський університет», 2006. – 215 с.
20. Гринюс Л.Л., Даугелавичюс Р.Ю., Алькімавичюс Г.А. Исследование мембранного потенциала клеток *Bacillus subtilis* и *Escherichia coli* методом проникающих ионов // *Биохимия.* – 1980. – Т. 45, № 9. – С. 1609–1618.
21. Огурцов А.Н., Ближнюк О.Н., Антропова Л.А. Физико-химические основы биотехнологии. Практикум. Учебное пособие. – Харьков, НТУ «ХПИ»: Видавничий центр НТУ «ХПИ», 2014. – 146 с.

22. Kouhkan M., Ahagar P., Babaganjeh L.A. et al. Biosynthesis of copper oxide nanoparticles using *Lactobacillus casei* Subsp. *Casei* and its anticancer and antibacterial activities // *Curr. Nanosci.* –2020. – V. 16, N 1. – P. 101–111.
23. Головка А.М., Резніченко Л.С., Романько М.С. та ін. Оцінювання та контролювання біологічної безпеки наноматеріалів у ветеринарній медицині // *Вісник аграрної науки.* – 2011. – № 5. – С. 24–27.
24. Alizadeh S., Seyedalipour B., Shafieyan S. et al. Copper nanoparticles promote rapid wound healing in acute full thickness defect via acceleration of skin cell migration, proliferation, and neovascularization // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2019. – V. 517, N 4. – P. 684–690.
25. Jayaramudu T., Varaprasad K., Reddy K.K. et al. Chitosan-pluronic based Cu nanocomposite hydrogels for prototype antimicrobial applications // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2020. – V 143. – P. 825–832.
26. Qiu H., Pu F., Liu Z. et al. Hydrogel-based artificial enzyme for combating bacteria and accelerating wound healing // *Nano Res.* – 2020. – V. 13, N 2. – P. 496–502.
27. Albright L.J., Wilson E.M. Sub-lethal effects of several metallic salts-organic compounds combinations upon the heterotrophic microflora of a natural water // *Water Res.* – 1974. –V. 8. – P. 101–105.
28. Дибкова С.М. Метод ДНК-комет в оцінці безпечності наночастинок металів біотехнологічного та медичного призначення // *Вісник проблем біології і медицини.* – 2014. – Т. 3, № 3(112). – С. 279–283.
29. Сімонов П.В. Дослідження гострої токсичності наночастинок міді при внутрішньошлунковому введенні мишам // *Фармакологія та лікарська токсикологія.* – 2015. – № 4–5 (45). – С. 79–86.
30. Сімонов П.В. Вплив наночастинок міді на показники гемодинаміки кролів у гострому експерименті // *Фарм. журнал.* – 2015. – № 4. – С. 96–102.

REFERENCES

1. Zhang N., Xiong G., Liu Z. Toxicity of metal-based nanoparticles: challenges in the nano era. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2022. **10**: 1001572.
2. Mu Y., Wu F., Zhao Q., Ji R., Qie Y., Yue Z., Hu Y., Pang C., Hristozov D., Giesy J.P., Xing B. Predicting toxic potencies of metal oxide nanoparticles by means of nano-QSARs. *Nanotoxicology.* 2016. **10**(9): 12074.
3. Cao, Y., Li, S., Chen, J. Modeling better in vitro models for the prediction of nanoparticle toxicity: a review. *Toxicol. Mech. Methods.* 2021. **31**(1): 1.
4. Yang W., Wan L., Mettenbrin, E.M., DeAngelis P.L., Wilhelm S. Nanoparticle toxicology. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2021. **61**: 269.
5. Ulberg Z.R., Gruzina T.G., Pertsov N.V. Colloidal and Chemical Properties of Biological Nanosystems. In: *Colloidal and Chemical Fundamentals of Nanoscience.* (Kyiv: Academperiodyka, 2005). [in Russian].
6. Aljerf L., AlMasri N.A. Gateway to metal resistance: bacterial response to heavy metal toxicity in the biological environment. *Annals of Advances in Chemistry.* 2018. **2**(1): 032.
7. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. *Molecular Biology of the Cell.* 4th edn. (New York: Garland Science, 2002).
8. Bradberry S.M. Metals (cobalt, copper, lead, mercury). *Medicine.* 2016. **44**(3): 182.
9. Chekman I.S., Ulberg Z.R., Malanchuk V.O., Gorchakova N.O., Zupanets I.A. *Nanoscience, Nanobiology, Nanopharmacy.* (Kyiv: Polygraph plus, 2012). [in Ukrainian].
10. Ermini M.L., Voliani V. Antimicrobial nano-agents: the copper age. Review. *ACS Nano.* 2021. **15**(4): 6008.
11. Studer A.M., Limbach L.K., Van Duc L., Krumeich F., Athanassiou E.K., Gerber L.C., Moch H., Stark W.J. Nanoparticle cytotoxicity depends on intracellular solubility: comparison of stabilized copper metal and degradable copper oxide nanoparticle. *Toxicol. Lett.* 2010. **197**(3): 169.
12. Nikolova M.P., Chavali M.S. Metal oxide nanoparticles as biomedical materials. *Biomimetics.* 2020. **5**(2): 27.
13. Zhou Y., Wei F., Zhang W., Guo Z., Zhang L. Copper bioaccumulation and biokinetic modeling in marine herbivorous fish *Siganus oramin.* *Aquat. Toxicol.* 2018. **196**: 61.
14. Ahamed M., Alhadlaq H.A., Majeed Khan M.A., Karuppiyah P. Synthesis, characterization, and antimicrobial activity of copper oxide nanoparticles. *J. Nanomaterials.* 2014. **3**: 1.
15. Rubilar O., Rai M., Tortella G., Diez M.C., Seabra A.B., Durán N. Biogenic nanoparticles: copper, copper oxides, copper sulphides, complex copper nanostructures and their applications. *Biotechnol. Lett.* 2013. **35**(9): 1365.
16. De Man J.C., Rogosa M., Sharpe M.E. A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* 1960. **23**(1): 130.
17. Dukhin S.S., Deryagin B.V. *Electrophoresis.* (Moscow: Nauka, 1976). [in Russian].

18. Kompanets I.V. *Methodological Recommendations for a Special Course and a special Workshop. Determination of the Structure and Functions of Biological Membranes*. (Electronic manual www.biol.univ.ua, 2013). [in Ukrainian].
19. Ostapchenko L.I., Mykhailyk I.V. *Biological Membranes: Methods of Structure and Function Research: Study Guide*. (Kyiv: Publishing and printing center “Kyiv University”, 2006). [in Ukrainian].
20. Grinius L.L., Daugelavichius R.Yu., Alkimavichius G.A. Investigation of membrane potential of *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* cells by penetrating ion method. *Biochemistry*. 1980. **45**(9): 1609. [in Russian].
21. Ogurtsov A.N., Blyzniuk O.N., Antropova L.A. *Physicochemical Fundamentals of Biotechnology. Practical Guidance. Tutorial*. (Kharkov: Publishing Center NTU “KhPU”, 2014).
22. Kouhkan M., Ahagar P., Babaganjeh L.A., Allahuari-Devin M. Biosynthesis of copper oxide nanoparticles using *Lactobacillus casei* Subsp. *Casei* and its anticancer and antibacterial activities. *Curr. Nanosci.* 2020. **16**(1): 101.
23. Golovko A.M., Reznichenko L.S., Roman’ko M.E., Gruzina T.G., Dybkova S.M., Ulberg Z.R. Evaluation and control of biological safety of nanomaterials in veterinary medicine. *Bulletin of agrarian science*. 2011. **5**: 24. [in Ukrainian].
24. Alizadeh S., Seyedalipour B., Shafieyan S., Kheime A., Mohammadi P., Aghdami N. Copper nanoparticles promote rapid wound healing in acute full thickness defect via acceleration of skin cell migration, proliferation, and neovascularization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2019. **517**(4): 684.
25. Jayaramudu T., Varaprasad K., Reddy K.K., Pyarasani R.D., Akbari-Fakhrabad A., Amalraj J. Chitosan-pluronic based Cu nanocomposite hydrogels for prototype antimicrobial applications. *Int. J. Biol. Macromol.* 2020. **143**: 825.
26. Qiu H., Pu F., Liu Z., Liu X., Dong K., Liu C., Ren J., Qu X. Hydrogel-based artificial enzyme for combating bacteria and accelerating wound healing. *Nano Res.* 2020. **13**(2): 496.
27. Albright L.J., Wilson E.M. Sub-lethal effects of several metallic salts-organic compounds combinations upon the heterotrophic microflora of a natural water. *Water Res.* 1974. **8**: 101.
28. Dybkova S.M. The DNA-comet method in assessing the safety of metal nanoparticles for biotechnological and medical purpose. *Bulletin of Biology and Medicine Problems*. 2014. **3**(3): 279. [in Ukrainian].
29. Simonov P.V. Investigation of acute toxicity of copper nanoparticles by intragastric injection to mice. *Pharmacology and drug toxicology*. 2015. **4–5**: 79. [in Ukrainian].
30. Simonov P.V. Effect of copper nanoparticles on hemodynamic parameters of rabbits in an acute experiment. *Pharmaceutical Journal*. 2015. **4**: 96. [in Ukrainian].

Надійшла 06.03.2023, прийнята 05.09.2023