

## ВПЛИВ КОЛОЇДНОГО СРІБЛА НА ДРІЖДЖОВІ КЛІТИНИ

**С.П. Туранська, В.В. Янишпольський, В.В. Туров, П.П. Горбик**

*Інститут хімії поверхні ім. О.О. Чуйка Національної академії наук України  
вул. Генерала Наумова, 17, 03164, Київ-164*

*Дослідження життєздатності дріжджових клітин у водних суспензіях, що містили нанорозмірне срібло, показали відсутність його цитотоксичної дії. Це може бути пов'язано з використанням методики приготування наночастинок без допоміжних речовин, що могли б виявляти цитотоксичний ефект, зв'язуванням наночастинок з клітинами в невеликій кількості або ж наявністю механізмів, що перешкоджають проникненню в клітини сторонніх нанорозмірних об'єктів. Введення колоїдного срібла в клітинну суспензію супроводжується істотним зменшенням кількості слабо асоційованої води при одночасному рості кількості сильно асоційованої води.*

Оскільки останнім часом стійкість більшості бактерій до антибіотиків значно зросла, нагальною необхідністю стає пошук альтернативних типів антимікробних препаратів. Зокрема встановлено, що значну антимікробну активність можуть проявляти деякі, загалом інертні метали (срібло, золото), якщо їх перевести в нанорозмірний стан. Речовина в нанорозмірному стані проявляє властивості як молекул (квантування енергії), так і об'ємних речовин (наявність фазових переходів), завдяки чому їй стають притаманні унікальні біофізичні та біохімічні властивості. Хоча нанотехнології є найперспективнішим напрямком розробки нових лікарських засобів, до теперішнього часу лише кілька нанопродуктів використовуються з цією метою. Серед них найвідомішим є наносрібло з розміром частинок менше 100 нм, що містять 20 - 15000 атомів Ag [1]. Але для розширення області використання наносрібла необхідно проведення всебічних досліджень його біоактивності і токсичності при взаємодії з різними типами мікроорганізмів.

Бактерицидний ефект наночастинок срібла в водних розчинах стосовно різних видів мікроорганізмів спостерігався в багатьох дослідженнях [2 – 4]. Однак при кількісних оцінках ефективності наносрібла слід враховувати, що стабілізатори, які використовуються при синтезі, також можуть вносити певний вклад в антимікробну активність [2]. Встановлено, що наночастинок срібла зберігають свою бактерицидну активність і в разі їх адсорбції на твердих поверхнях, зокрема на поверхні кремнезему [5]. Незважаючи на те, що бактерицидні властивості срібла використовуються протягом багатьох сторіч, питання його токсичності при використанні в медицині залишається дискусійним [6].

Метою роботи було дослідження впливу колоїдного розчину, що містить нанорозмірні частинки срібла, на біометричні показники дріжджів при зовнішньому контакті клітин з наночастинками та характеристики внутрішньоклітинної води в частково дегідратованих дріжджових клітинах в присутності слабополярного органічного середовища, що має місце при проникненні наночастинок всередину клітин.

### **Результати та їх обговорення**

Зазвичай, при синтезі колоїдних розчинів срібла використовують стабілізатори органічної та неорганічної природи (поверхнево-активні речовини, полівінілпіролідон, бензофенон, диметилсульфоксид, формальдегід, гідразин,  $\text{NaNH}_4$  та ін.), концентрація яких сумірна з концентрацією наночастинок [7, 8]. З метою виключення впливу стабілі-

затворів та інших домішок на досліджувані клітини, нами було застосовано методику одержання колоїдних розчинів Ag без використання допоміжних речовин, що могли б виявляти цитотоксичний ефект.

Для синтезу наночастинок срібла до 0,5 мл 10 % (по об'єму) розчину триетоксисилану в етанолі при інтенсивному перемішуванні при кімнатній температурі добавляли 100 мл водного розчину азотнокислого срібла ( $10^{-4}$  моль/л). Внаслідок реакції відновлення отримували колоїдний розчин частинок срібла світло-жовтого (золотистого) кольору, що обумовлено наявністю поверхневого плазмонного резонансу. Стабілізація забарвлення розчинів спостерігалась через 20 хв після змішування реагентів.

Як відомо, кремнійорганічні сполуки з Si – H групами є сильними відновниками ряду металів. Основною відновлюючою часткою є гідрид-іон, який утворюється при гідролізі Si – H зв'язків [9]. Саме ці властивості триетоксисилану і були використані при отриманні наночастинок срібла в даній роботі.

Зазначимо, що при застосуванні даної методики синтезу в колоїдному розчині, окрім наночастинок срібла, міститься кремнезем, утворений із триетоксисилану, та залишки нітрат-іонів, що входили до нітрату срібла. У відповідності з [10], наявність у водних середовищах наночастинок кремнезему, навіть при невеликій концентрації, може призводити до пригнічуючої або стимулюючої дії на клітинні системи.

Життєздатність дріжджових клітин *Saccharomyces cerevisiae* досліджувалась при їх витримуванні в розчині, що містив наночастинок Ag у концентрації 0,001 % (близька до граничної), а також високодисперсний кремнезем (0,003 %) та залишки азотної кислоти  $\text{NO}_3^-$  (0,0006 %). Життєздатність клітин, що перебували в такому розчині протягом 7 діб, визначали цитохімічним методом з використанням барвника метиленового синього. Також досліджували вплив колоїдного срібла при його концентрації в суспензії дріжджових клітин 0,0002 % на процес спиртового бродіння, шляхом визначення різниці в кількості виділеного  $\text{CO}_2$ .

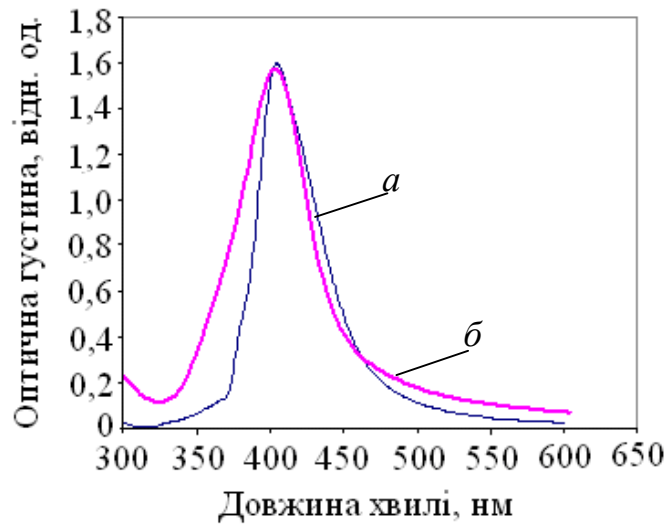
Життєздатність дріжджових клітин у розчині колоїдного срібла становила близько 100 %, про що свідчили досліди по їх забарвленню метиленовим синім. Так, дріжджові клітини, що перебували тривалий час у розчині колоїдного срібла (добу і більше), не втрачали здатності відновлення (ферментами дихального ланцюга) барвника метиленового синього.

Вимірюваннями об'ємів вуглекислого газу, виділеного клітинами, що перебували і не перебували в контакт з колоїдним сріблом, істотної різниці не виявлено.

Спектри оптичного поглинання суспензії в УФ та видимому діапазоні вивчали за допомогою спектрофотометра Specord M40 (рис. 1, кр. а). Пік поверхневого плазмонного резонансу проявляється при 405 нм. Аналіз спектру оптичної густини колоїдного розчину срібла проводили з використанням теорії Мі [11] з метою оцінки розміру наночастинок срібла та їх однорідності за положенням та шириною піку поверхневого плазмонного резонансу. На рис. 1, кр. б) наведено розрахунковий спектр оптичного поглинання водної суспензії колоїдного срібла з середнім розміром частинок 4,2 нм і дисперсією за розмірами 30 %. Видно, що експериментальна та розрахункова криві в області максимуму поглинання майже співпадають.

Спектри  $^1\text{H}$  ЯМР вивчали за допомогою спектрометра високої роздільної здатності Varian Mercury 400. Температуру регулювали з точністю  $\pm 1$  К, з використанням термоприставки Bruker VT-1000. Інтенсивності сигналів води визначали з точністю  $\pm 5$  %. Параметри зв'язаної води вимірювали методом  $^1\text{H}$  ЯМР спектроскопії із застосуванням методики виморожування рідкої фази [12]. Завдяки адсорбційним взаємодіям, вода, що локалізована біля зовнішньої і внутрішньої поверхонь клітин, молекул біополімерів або поверхні наночастинок, замерзає при температурах, нижчих 273 К. Для міжфазної води зниження температури замерзання ( $273 - T$ ) пропорційно зміні вільної

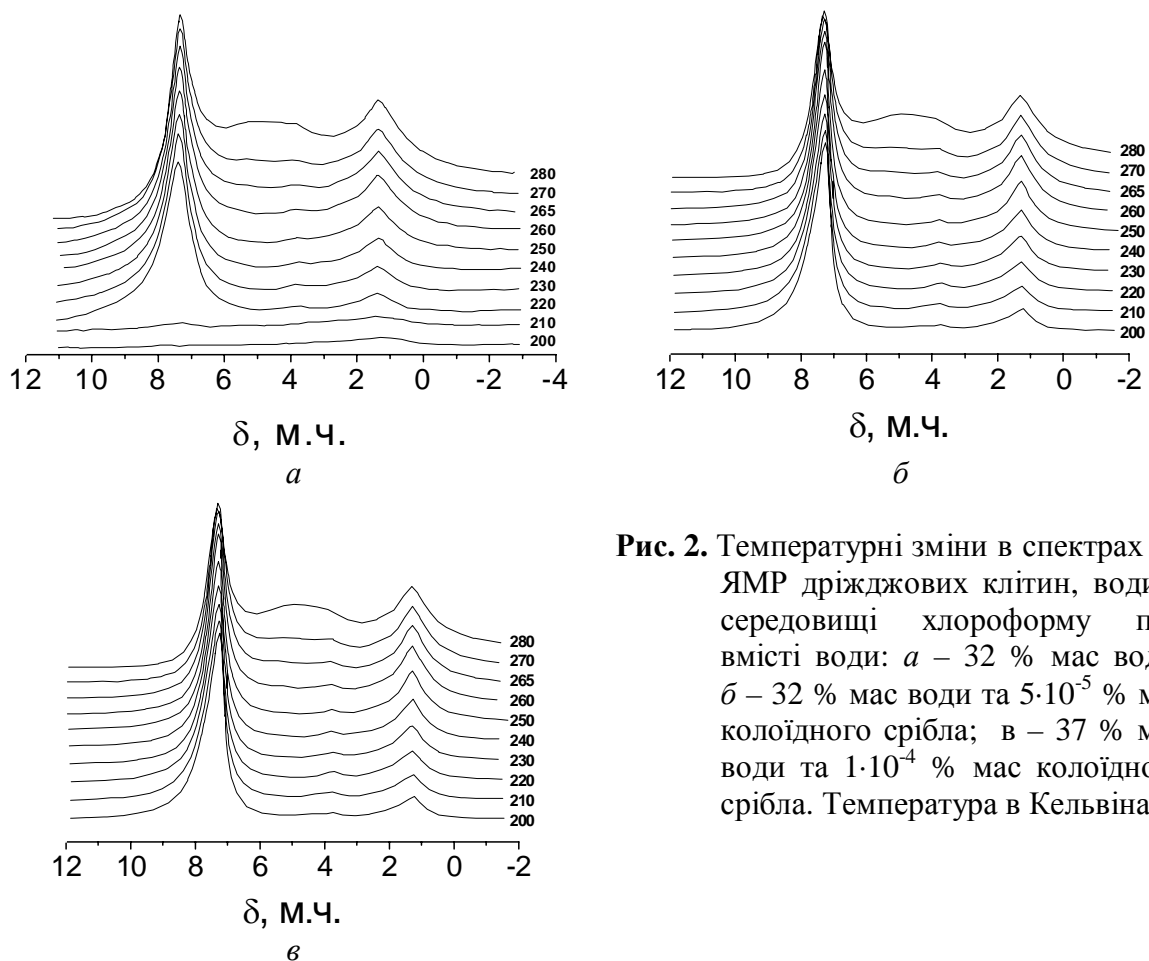
енергії Гіббса ( $\Delta G$ ). Зазвичай розрізняють сильно- та слабозв'язану воду. При цьому слабозв'язаною можна вважати ту частину міжфазної води, що замерзає при  $T > 250$  К (або  $\Delta G < -0,5$  кДж/моль). З метою запобігання переохолодження водних систем при їх заморожуванні, вимірювання інтенсивності ( $I$ ) сигналу незамерзаючої води проводили при попередньому охолодженні зразка до 220 К. На основі залежностей  $I(T)$ , у відповідності з [12] розраховували зміни вільної енергії Гіббса від концентрації незамерзаючої води ( $\Delta G(C_{UW})$ ). Тоді площа, обмежена графіком залежності ( $\Delta G(C_{UW})$ ), екстрапольованим до осей координат, пропорційна величині міжфазної енергії  $\gamma_s$ .



**Рис. 1.** Спектр поглинання колоїдного розчину срібла в УФ та видимому діапазоні. Смуга поверхневого плазмонного резонансу біля 405 нм. *a* – експериментальний спектр, *b* – спектр частинок срібла у воді, розрахований по теорії Мі [11]. Середній діаметр частинок 4,2 нм, дисперсія за розмірами 30 %.

На рис. 2 наведено температурні зміни в спектрах  $^1\text{H}$  ЯМР частково зневоднених (до 27 % мас) дріжджових клітин, до яких додавались в рівних кількостях (5 % мас) дистильована вода або колоїдний розчин нанорозмірного срібла. Після витримання 10 хв в ЯМР ампулі при постійному перемішуванні, зразки занурювались в середовище хлороформу. Передбачалось, що завдяки переміщенню частина хлороформу перейде крізь клітинну мембрану, а разом з ним до клітин будуть переміщуватись і наночастинки колоїдного срібла. В той же час, присутній в суспензії кремнезем, розміри частинок якого можуть бути істотно більшими, повинен затримуватись клітинною мембраною і не мати суттєвого впливу на внутрішньоклітинну воду.

Як видно з даних рис. 2, в спектрах роздільно реєструються сигнали сильноасоційованої (з хімічним зсувом 3 – 5 м.ч.) і слабоасоційованої (з хімічним зсувом 1,1 м.ч.) води, що збігається з результатами попередніх досліджень [13, 14]. Зі зниженням температури інтенсивність сигналу сильноасоційованої води зменшується значно сильніше, ніж слабоасоційованої. Тобто вся слабоасоційована вода є сильнозв'язаною, в той час як більша частина сильноасоційованої води є слабозв'язаною. В спектральній області, що відповідає сильноасоційованій воді, в спектрах на фоні широкого основного сигналу води можна спостерігати менш інтенсивний, але більш вузький сигнал з хімічним зсувом  $\delta = 3,5$  м.ч. Імовірно, він зумовлений сильноасоційованою водою, що перебуває в найбільш вузьких порожнинах, утворених структурними елементами клітин. Крім сигналів води, в спектрах спостерігається інтенсивний сигнал хлороформу з хімічним зсувом  $\delta = 7,26$  м.ч.

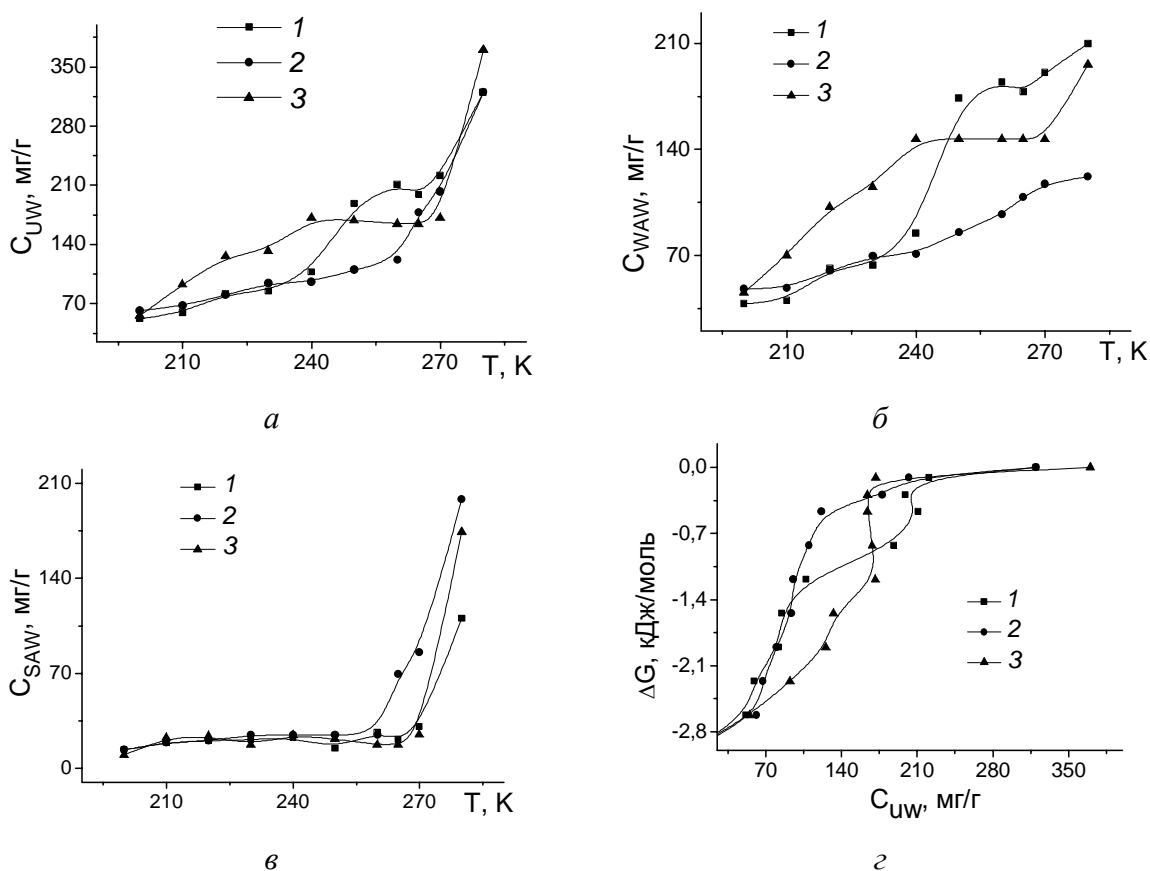


**Рис. 2.** Температурні зміни в спектрах  $^1\text{H}$  ЯМР дріжджових клітин, води в середовищі хлороформу при вмісті води: *a* – 32 % мас води; *б* – 32 % мас води та  $5 \cdot 10^{-5}$  % мас колоїдного срібла; *в* – 37 % мас води та  $1 \cdot 10^{-4}$  % мас колоїдного срібла. Температура в Кельвінах.

На рис. 3 наведено графіки залежностей концентрації загальної кількості незамерзаючої води (рис. 3, *a*), слабоасоційованої (*б*) та сильноасоційованої (*в*) води від температури, а також розраховані на основі даних рис. 3 *a* залежності зміни вільної енергії Гіббса від концентрації незамерзаючої води (*г*). Ці залежності мають складний характер, обумовлений присутністю в клітинах нанорозмірних порожнин різного розміру. Введення  $5 \cdot 10^{-5}$  % мас нанорозмірного срібла супроводжується істотним зменшенням кількості слабоасоційованої води (рис. 3, *б*) при одночасному рості кількості сильноасоційованої води (рис. 3, *в*). Це може бути пояснено загальною властивістю поверхні, у даному випадку негативно зарядженої поверхні срібла, збільшувати структурованість води. За даними [15], льодоподібна структура води, асоційованої сіткою водневих зв'язків, добре сформована біля гідрофільних поверхонь і стає менш характерною при віддаленні від поверхні. Структурованість води зменшується біля гідрофобних поверхонь. Подальше збільшення концентрації нанорозмірного срібла призводить до деякого зростання кількості як слабо- так і сильноасоційованої води, але, імовірно, це пов'язано із загальним збільшенням концентрації зв'язаної води. На основі графіків залежності  $\Delta G(C_{uw})$  (рис. 3, *г*) розраховувались величини міжфазної енергії в системі клітини-вода. Величина  $\gamma_s = 19$  Дж/г для вихідного зразка,  $\gamma_s = 16$  Дж/г для зразка, що містив  $5 \cdot 10^{-5}$  % мас Ag, і  $\gamma_s = 22$  Дж/г для зразка зі збільшеною на 20 % кількістю води і до  $1 \cdot 10^{-4}$  % мас Ag.

Суттєві зміни форми кривих залежностей  $\Delta G(C_{uw})$  при додаванні до клітин колоїдного срібла свідчать про значні зміни в розподілі за розмірами внутрішньоклітинних порожнин, в яких саме і знаходиться слабоасоційована вода. Тобто одержані результати вказують на можливість проникнення наночастинок срібла в клітини. Оскільки концент-

рація наночастинок, під впливом яких здійснюються зміни у будові внутрішнього простору клітин, надзвичайно мала, слід очікувати, що при проникненні в клітини наносрібло може мати дуже високу біологічну активність.



**Рис. 3.** Температурні залежності концентрації незамерзаючої води для суспензії дріжджових клітин в хлороформі: *a* – загальної концентрації незамерзаючої води; *б* – слабкоасоційованої води; *в* – сильноасоційованої води; *г* – залежність зміни вільної енергії Гіббса від загальної концентрації незамерзаючої води (*1* – вихідний зразок, *2* – зразок, що містив  $5 \cdot 10^{-5}$  % мас колоїдного срібла, *3* –  $1 \cdot 10^{-4}$  % мас срібла).

## Висновки

Біометричне тестування впливу колоїдних розчинів нанорозмірного срібла, що не містять біологічно активних стабілізуючих компонентів, на параметри життєдіяльності дріжджових клітин в водних суспензіях не виявило істотної цитотоксичної активності наноматеріалу. Можливо, це пов'язано зі стійкістю обраного типу клітин до зовнішніх збуджень і (або) наявністю в них механізмів, що перешкоджають проникненню в клітини (що знаходяться в фазі активної діяльності) сторонніх нанорозмірних об'єктів. В той же час, для клітин в стані анабіозу, при наявності слабополярного органічного середовища, зареєстровано значні зміни в енергетичних параметрах внутрішньоклітинної води. Вони відбуваються під дією дуже малих концентрацій колоїдного срібла. Імовірно, під впливом органічних речовин здійснюється проникнення наночастинок у внутрішньоклітинний простір, де вони значною мірою змінюють внутрішню морфологію клітин та стан міжфазної води. Можна очікувати, що при додаванні до живильного середовища, в якому культивуються клітини, деяких типів нетоксичних органічних речовин (наприклад

диметилсульфоксид), які підвищують проникність клітинних мембран, цитотоксична дія колоїдного срібла може бути суттєво збільшена.

### Література

1. Chen X., Schluesener H.J. Nanosilver: A nanoproduct in medical application // *Toxicology Lett.* – 2008. – V. 176. – P. 1 – 12.
2. The study of antimicrobial activity and preservative effects of nanosilver ingredient / K.-H. Choa, J.-E. Park, T. Osaka, S.-G. Park // *Electrochimica Acta.* – 2005. – V. 51. – P. 956 – 960.
3. Kim J. S. Antimicrobial effects of silver nanoparticles // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine.* – 2007. – V. 3. – P. 95 – 101.
4. Sondi I., Salopek-Sondi B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria // *J. Coll. Interface Sci.* – 2004. – V. 275. – P. 177 – 182.
5. Bugla-Płoskońska G., Leszkiewicz A. Bactericidal properties of silica particles with silver islands located on the surface // *International Journal of Antimicrobial Agents.* – 2007. – V. 29. – P. 73 – 748.
6. Hongbao M., Deng-Nan H., Shen C. Colloidal Silver // *Journal of American Science.* – 2007. – V. 3, № 3. – P. 74 – 77.
7. Prucek R., Kvíték L., Hrbáč J. Silver colloids - methods of preparation and utilization // *Acta universitatis palackianae olomucensis. Facultas rerum naturalium.* – 2004. – Chemica. – P. 43.
8. Photochemical preparation of nanoparticles of Ag in aqueous-alcoholic solutions and on the surface of mesoporous silica / G.V. Krylova, A.M. Eremenko, N.P. Smirnova, S. Eustis // *Theoretical and Experimental Chemistry.* – 2005. – V. 41, № 2. – P.105 – 110.
9. Буткевич Г.Б., Слиякова И.Б., Неймарк И.Е. Гели кремнийорганических соединений // *Коллоидный журн.* – 1966. – Т. 28, № 1. – С. 21 – 25.
10. Медицинская химия и клиническое применение диоксида кремния / Под ред. А.А. Чуйко. – К.: Наук. думка, 2003. – 416 с.
11. Програма MiePlot v4001. <http://www.philiplaven.com/mieplot.htm>.
12. Turov V.V., Leboda R. <sup>1</sup>H NMR spectroscopy of adsorbed molecules and free surface energy of carbon adsorbents // *Physics and chemistry of carbons.* – 2000. – V. 27. – P. 67 – 124.
13. Асоціати води у частково зневоднених дріжджах і на поверхні гідрофобного кремнезему / С.П. Туранська, В.В. Туров, В.М. Гунько, В.М. Богатирьов // *Хімія, фізика та технологія поверхні.* – К.: Вид. дім «КМ Академія». – 2004. – Вип. 10. – С. 207 – 211.
14. Structured water in partially dehydrated yeast cells and at partially hydrophobized fumed silica surface / V.V. Turov, V.M. Gun'ko, V.M. Bogatyrev, V.I. Zarko, S.P. Gorbik, E.M. Pakhlov, R. Leboda, O.V. Shulga, A.A. Chuiko // *J. Coll. Interface Sci.* – 2005. – V. 283. – P. 329 – 343.
15. Dias C.R., de Pinho M.N. Water structure and selective permeation of cellulose-based membranes // *Journal of molecular liquids.* – 1999. – V. 80. – P. 117 – 132.

# **EFFECT OF COLLOIDAL SILVER ON YEAST CELLS**

**S.P. Turanska, V.V. Yanishpolskiy, V.V. Turov, P.P. Gorbyk**

*Chuiko Institute of Surface Chemistry of National Academy of Sciences of Ukraine  
General Naumov Str. 17, 03164 Kyiv-164*

*When examining yeast cell viability nanosized silver in water suspensions was shown cytotoxicity. That may be caused by the nanoparticle preparation technique to have no used without application any auxiliary substances binding small quantities of nanoparticles with cells, or by existing mechanisms that obstacle permeation of extraneous foreign nanosized objects into cells. The introduction of colloidal silver into cell suspension is accompanied by the substantial diminution in the quantity of weakly associated water with simultaneous growth in that of strongly associated one.*