

УДК 535.37:544.723.2:547.42

## ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ВИСОКОДИСПЕРСНОГО КРЕМНЕЗЕМУ, МОДИФІКОВАНОГО ПОЛІОЛАМИ, НА ЖИТТЄДІЯЛЬНІСТЬ РЕПРОДУКТИВНИХ КЛІТИН МЕТОДОМ ФОТОН-КОРЕЛЯЦІЙНОЇ СПЕКТРОСКОПІЇ

Н.П. Галаган, \*В.В. Власенко, Н.С. Настасієвська, О.Д. Чубина

Інститут хімії поверхні НАН України, 03680, м. Київ - 164, вул. Генерала Павлова, 17

\*Міжвідомчий науково-технологічний центр "Агробіотех", 02094, Київ - 94, вул. Урожайності, 2

Надійшла до редакції 31 травня 2005 р.

В роботі методом фотон-кореляційної спектроскопії оцінено біологічну активність високодисперсного кремнезему (ВДК) А-300 та матеріалів на його основі по життєздатності стимуляції репродуктивних клітин за параметрами їх руху. Доведено, що додавання кремнезему А-300 та кремнієвому, модифікованому сорбітом, до суспензії репродуктивних клітин бика в межах певних концентрацій стимулює їх життєздатність. Встановлено, що тривалість життя клітинної суспензії з додаванням діоксиду кремнію та його модифікованих форм є більшою в порівнянні з контролем.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** кремнезем, полііоли, наноматеріали, біологічна активність, фотон-кореляційна спектроскопія.

Біотехнології із застосуванням клітин різного походження набувають все більшого розвитку [1]. Життєдіяльність клітин в цьому випадку забезпечується певним комплексом факторів живильних середовищ, оптимізація яких сприяє інтенсифікації технологічного процесу. Різноманітні форми встановлена можливість застосування ВДК та наноматеріалів на його основі у складі живильних середовищ для деяких клітин.

Біологічна активність наноматеріалів у складі середовищ для клітин оцінюється різними методами. З цієї точки зору особливий інтерес представляє метод фотон-кореляційної спектроскопії (ФКС), який дає змогу визначити життєздатність рухливих клітин, вимірюючи кількість рухомих клітин в %, швидкість поступального руху, енерговитрати клітин на рух у в'язкому середовищі [2].

Метою роботи було дослідження біологічної активності ВДК А-300 та кремнієвого, поверхня якого модифікована полііолами (сорбітом та ксилітом), методом ФКС.

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Об'єктами дослідження була розморожена після кріоконсервування в стандартному лактозо-гліцерин-жовтковому кріосередовищі сперма биків, що доставлялась із "Спермбанку" (Київська обл., м. Бровари). В досліджах використовували аморфний ВДК з питомою поверхнею  $300 \text{ м}^2/\text{г}$  (м. Калуш Івано-Франківської обл.) та кремнезему, модифіковані вуглеводневими спиртами – сорбітом (ВДК-С) та ксилітом (ВДК+К). Модифікацію здійснювали методом рівноважної адсорбції з водного розчину, як описано в [4]. Біологічну активність наноматеріалів оцінювали по життєздатності клітинної стимуляції за параметрами руху, що визначались на програмно-апаратному комплексі "Спектрал" методом ФКС [5].

Розморожування гранул сперми здійснювали в 2,9% розчині цитрату натрію (рН=7) при температурі  $37^\circ\text{C}$ . Після цього до розмороженої сперми додавали наноматеріали в певних концентраціях  $2 \times 10^{-6}\%$  -  $6 \times 10^{-1}\%$ . Контролем була клітинна суспензія без досліджуваного наноматеріалу. В кювету вносили 300-500 мкл суспензії репродуктивних клітин і поміщали її в область променя He-Ne лазера, довжина хвилі якого становила 632,8 нм, а потужність - 0,2 мВт. Діаметр освітленої ділянкою зони - 500 мкм. Під час вимірювання в кюветі автоматично підтримувалась температура  $37^\circ\text{C}$ . Тривалість одного виміру становила 3 хв. Метод ФКС базується на реєстрації дисперсійного зсуву частоти, який проявляється при розсіянні лазерного світла на рухливій частинці. При цьому в процесі застосовується оптичне гетеродинаміювання без зсуву частоти світла в опорному промені. Частотний аналіз сигналу фотодетектора здійснюється методом цифрової кореляційної обробки – побудовою автокореляційних функцій (АКФ). Кут детектування розсіяного світла становив  $15^\circ$ . АКФ амплітуди розсіяного на рухливих клітинах світла добре апроксимується Лоренцевою кривою, напівавірна якої обернено пропорційна вектору розсіяння і середній частоті обертання головки [6]. Для суспензій, яка складається з рухомих та нерухомих (мертвих) клітин кореляційна функція складається з швидко та повільно спадаючих компонент. Нерухомі клітини насправді мають деяку швидкість за рахунок впливу сусідніх



## Дослідження впливу високодисперсного кремнезему, модифікованого ...

спадаючих компонент. Нерухомі клітини насправді мають деяку швидкість за рахунок впливу сусідніх рухливих клітин і дають внесок в сумарну АКФ, але при часі затримки 100 мкс повільно спадаюча компонента від повільних клітин добре описується константою. Опрацьовуючи експериментальні АКФ розсіяного на рухливих клітинах світла, як описано в [7], отримували інформацію про середню швидкість руху в групі клітин ( $V$  (мкм/с)) та долю рухливих клітин  $\beta$  (%). Експериментально одержані коррелограми апроксимувались модельною формою кореляційної функції по методу найменших квадратів шляхом варіації  $\beta$  та  $\omega$ , де  $\omega$  (Гц) – частота обертання головки сперматозоїда. Швидкість розраховували по формулі:

$$V = \omega l, \quad (1)$$

де  $l$  – крок спіралі, для бичачих сперматозоїдів рівний 8,3 мкм. Енерговитрати (ум. од.) клітини на рух у в'язкому середовищі пропорційні потужності рухливої клітини, яка розраховується за формулою:

$$N = F \times V \quad (2)$$

де  $V$  – швидкість клітини, а  $F$  – сила в'язкого тертя, яка розраховується за формулою:

$$F = 6\pi \times \eta \times r \times V, \quad (3)$$

де  $\eta$  – коефіцієнт в'язкості середовища з репродуктивними клітинами бика,  $r$  – радіус клітини,  $V$  – швидкість руху. Підставивши вираз (3) в (2), отримаємо, що потужність рухливої клітини прямо пропорційна квадрату швидкості:

$$N = \gamma \times V^2, \quad (4)$$

де  $\gamma$  – коефіцієнт пропорційності, пов'язаний з формою, розмірами сперматозоїда та властивостями середовища. При розрахунку енерговитрат клітинної популяції враховували долю рухливих клітин в суспензії. Похибка методу не перевищувала 1%.

На дослідження серії клітинних суспензій з різними концентраціями досліджуваних матеріалів витрачали близько 1 години часу. Параметри руху клітин в дослідних та контрольних пробах порівнювали, враховуючи зниження активності клітинної популяції протягом часу вимірювання.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Клітинні суспензії відрізнялися по функціональній активності, тому початкова рухливість у них коливалась в межах 20 % - 50 %. Між тим результати експериментів показали, що в присутності як кремнезему А-300, так і модифікованих кремнеземів, спостерігали підвищення значень параметрів руху клітин порівняно з контролем. Відносні збільшення параметрів руху під дією досліджуваних матеріалів, які вимірювали через кожну годину експерименту, представлено на Рис.1, 2,3. Експерименти тривали протягом 5 - 7 годин, їх тривалість відповідала часу життя клітин в середовищах з досліджуваними матеріалами. Оскільки в контрольному середовищі сперматозоїди гинули раніше, чим в досліджуваному, то виміряні параметри руху порівнювали з відповідними параметрами для клітин в контрольному середовищі до моменту їх загибелі. Додавання до середовища з клітинами низьких ( $25 \times 10^{-6}$  %) та високих ( $15 \times 10^{-2}$  %) концентрацій наноматеріалів з досліджуваного діапазону не приводило до збільшень цих величин. Навпаки, великі концентрації досліджуваних наноматеріалів пригнічували життєдіяльність клітин.

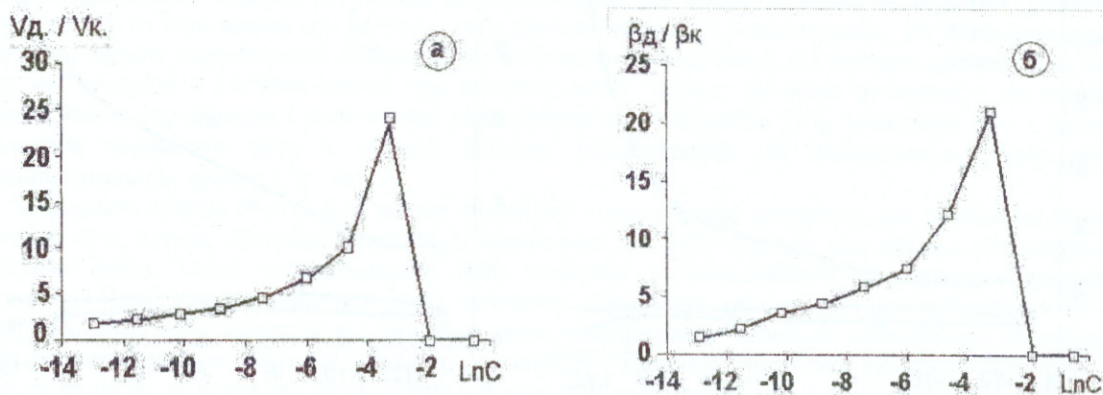


Рис. 1 Відношення швидкості ( $V_d/V_k$ ) - (а) та доли рухливих клітин ( $\beta_d/\beta_k$ ) - (б) при додаванні різних концентрацій ВДК в клітинне середовище до відповідних параметрів руху клітин в контрольному середовищі, розраховані для кожної години експерименту.



Досліджувані матеріали по-різному впливали на клітини. Додавання кремнієвому, модифікованого ксилітом, протягом перших 4-ох годин експерименту призводило до часткового зниження швидкості руху клітин в порівнянні зі сперміями контрольного середовища, причому нерівномірно для всього діапазону досліджуваних концентрацій (Рис. 2а).

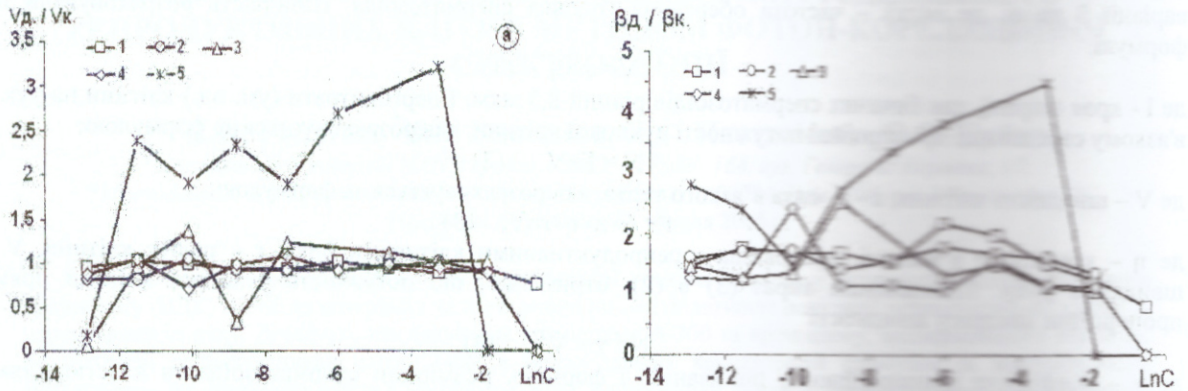


Рис. 2 Відношення швидкості ( $V_d/V_k$ ) - (а) та долі рухливих клітин ( $B_d/B_k$ ) - (б) при додаванні різних концентрацій досліджуваного препарату ВДК+К в клітинне середовище до відоміших параметрів руху клітин в контрольному середовищі, розраховані для кожної години експерименту. 1 – перша, 2 – друга, 3 – третя, 4 – четверта, п'ята години дослідження

Після цього спостерігали підвищення швидкості під дією наноматеріалу. Кількість рухливих клітин була більшою порівняно з контролем протягом всього експерименту (Рис. 3б), але по мірі тривалості дослідження різниця в рухливості між контролем і дослідом зменшувалась. Вислужена збільшення відсотку рухливих сперматозоїдів залежала від концентрації матеріалу в пробі. Присутність в пробах кремнезему, поверхня якого модифікована сорбітом, порівняно з контролем, призводила до збільшення швидкості руху клітин (Рис. 3а), хоча спостерігали нерівномірність її наростання по концентраціях. При цьому доля рухливих клітин в досліджуваних середовищах практично не змінювалась протягом трьох годин експерименту, тоді як в контрольному середовищі з кожною наступною п'ятихвилинною експерименту кількість рухливих клітин зменшувалась (Рис. 3б).

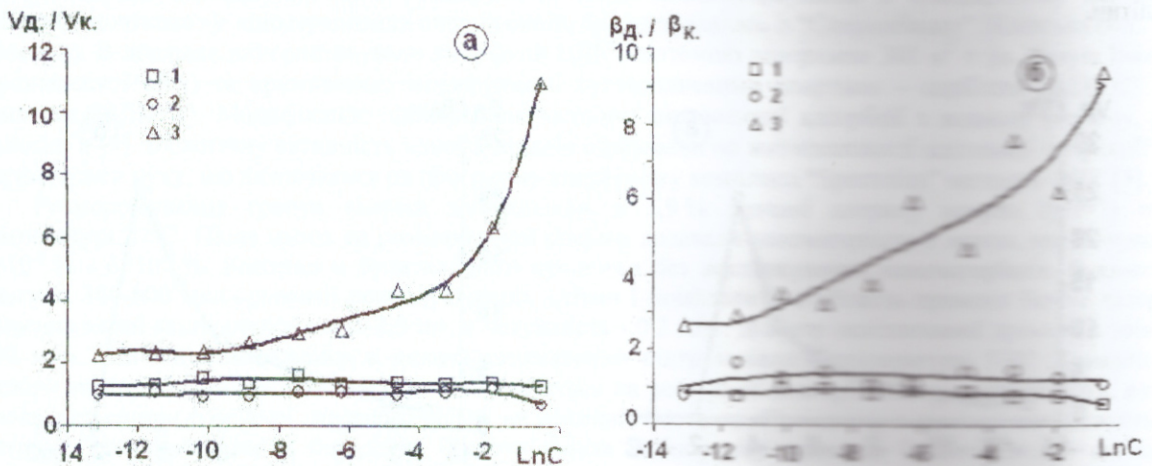


Рис. 3 Відношення швидкості ( $V_d/V_k$ ) - (а) та долі рухливих клітин ( $B_d/B_k$ ) - (б) при додаванні різних концентрацій досліджуваного препарату ВДК+С в клітинне середовище до відоміших параметрів руху клітин в контрольному середовищі, розраховані для кожної години експерименту. 1 – перша, 2 – друга, 3 – години дослідження



## Дослідження впливу високодисперсного кремнезему, модифікованого ...

Було розраховано відношення сумарної енергії клітин в присутності досліджуваних матеріалів протягом всього експерименту до сумарної енергії клітин в контрольному середовищі для всіх концентрацій досліджуваних препаратів (Рис.4 а, б, в). Ці розрахунки дали змогу порівнювати біологічну активність різних препаратів, навіть якщо експерименти проводилися в різні дні на клітинах з різних заморожених гранул.

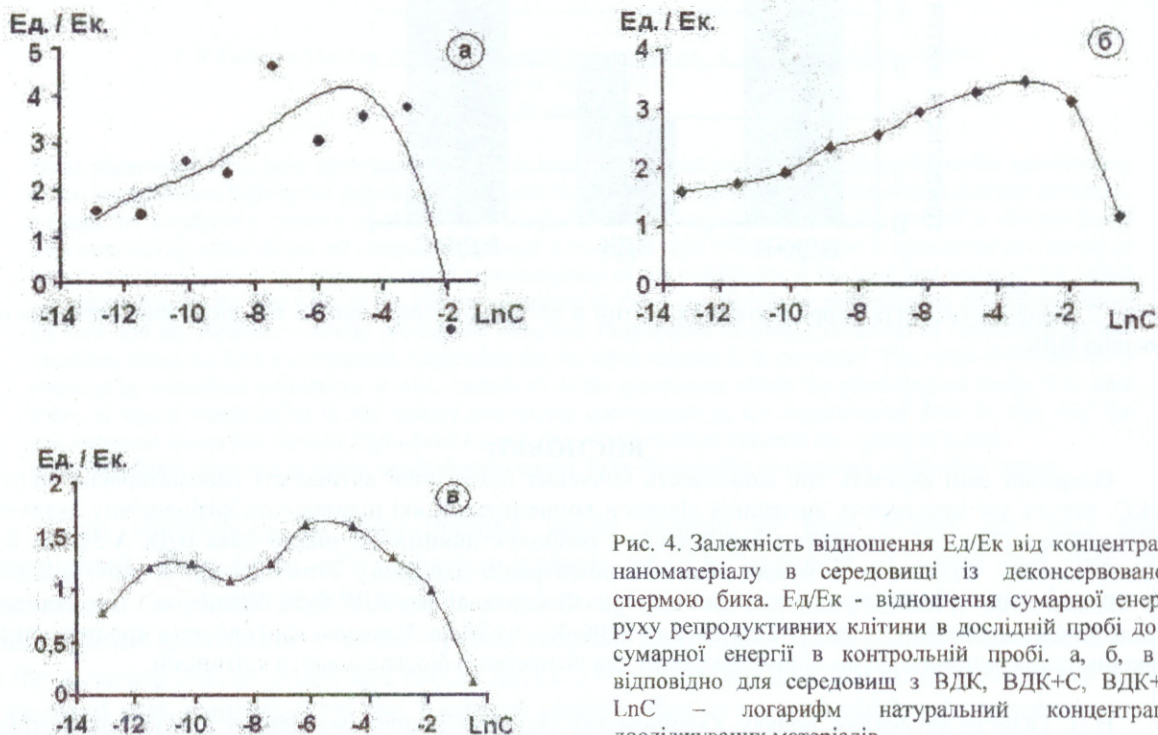


Рис. 4. Залежність відношення  $E_d/E_k$  від концентрації наноматеріалу в середовищі із деконсервованою спермою бика.  $E_d/E_k$  - відношення сумарної енергії руху репродуктивних клітини в дослідній пробі до їх сумарної енергії в контрольній пробі. а, б, в - відповідно для середовищ з ВДК, ВДК+С, ВДК+К.  $\text{Ln}C$  - логарифм натуральний концентрації досліджуваних матеріалів

Криві залежності швидкості руху та енергії від концентрацій у випадку модифікування ксилітом мали (Рис.4в) ввігнутість у середній частині концентрацій. Така форма кривої є досить характерною для подібних експериментів з використанням різних суспензій клітин та діючих факторів. Відомо [8,9], що клітини вищих організмів існують у вигляді деяких дискретних станів, що відрізняються по величині морфологічних і функціональних параметрів. Перехід з одного стану в інший залежить від впливу зовнішніх факторів. Можливо, що такими факторами можуть виступати високо дисперсний кремнезем та наноматеріали на його основі при великих для клітинної популяції концентраціях. Не виключено, що при досягненні певних концентрацій кремнезему в клітинному середовищі, він починає адсорбувати на себе білки, які присутні в сім'яній плазмі при заморожуванні сперми. Це може призводити до зменшення в'язкості цього середовища і полегшення пересування сперматозоїдів [10]. Можливо, це і є причиною збільшення параметрів руху в області більших концентрацій, які відповідають 2-ому піку на експериментальних кривих (Рис.4в).

За формою кривих (Рис.4а,б,в) можна визначити концентрацію матеріалу, яка найбільше стимулює життєздатність клітин. Діапазон активних концентрацій для  $\text{SiO}_2$  вужчий, ніж для його модифікованих поліолами форм. Отже модифікування його поверхні вуглеводневими спиртами призводить до розширення меж концентрацій під дією матеріалу. Це більш вигідно з технологічної точки зору. Біологічна активність залежала від сполуки, якою модифікована поверхня кремнезему. Відмінності у впливі на репродуктивні клітини, виявлені для сорбіту та ксиліту, можливо, визначаються структурою молекул поліолів та різницею функціональної ролі цих двох вуглеводів в організмі. Хоча з Рис. 4а,б,в видно, що по збільшенню енергії руху найактивнішим виявився кремнезем.

Слід зазначити, що за наявності всіх досліджуваних наноматеріалів в середовищі із репродуктивними клітинами спостерігали підвищення тривалості їх життя по відношенню до контрольної суспензії. Величина підвищення залежала від структури поверхневого шару кремнезему (Рис.5).



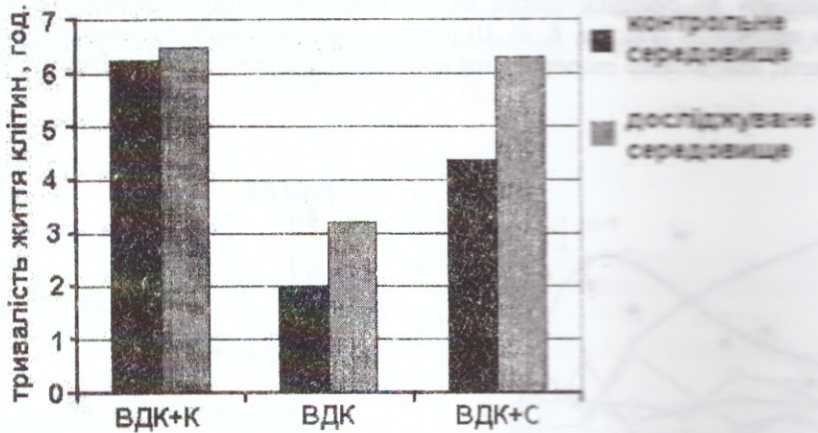


Рис. 2. Тривалість життя репродуктивних клітин в клітинному середовищі під дією наноматеріалів на основі ВДК

### ВИСНОВКИ

Одержані дані свідчать про можливість вивчення біологічної активності наноматеріалів методом ФКС. Метод дає можливість визначити діапазон концентрацій, які підвищують фізіологічну активність клітин. Доведено, що додавання в середовище з репродуктивними клітинами біона ВДК А-300 та ВДК, модифікованих поліоломи, в межах певних концентрацій дає змогу стимулювати їх життєздатність. Встановлено, що тривалість життя клітин в суспензії з додаванням ВДК була більше на 1 год. порівняно з контролем, для ВДК+С – на 1 год.50 хв., для ВДК+К – на 20 хв. Наведені дані свідчать про перспективу використання наноматеріалів з біомолекулами для оптимізації біосередовищ з клітинами.

Н.П. Галаган висловлює подяку Українському Науково-Технічному Центру (УНТЦ) за підтримку цієї роботи (грант УНТЦ №3103)

### ЛІТЕРАТУРА

1. Біохімія тварин, рослин, мікроорганізмів та біотехнологія. // Український біологічний журнал. 2002. - 74, №46 (додаток 2).- 205 с.
2. Медицинская химия и клиническое применение диоксида кремния / Под ред. О.О. Чуйко. -К.: Наукова думка, 2003. - 415 с.
3. Vlasenko V.V., Galagan N.P., Kulik T.V., Pokrovskiy V.A. Studies adsorption of carbohydrates on ultrafine silica surface by means of mass spectrometry and laser Doppler spectrometry // VII Polish-Ukrainian Symposium on Theoretical and Experimental Studies of Interfacial Phenomena and their Technological Application (Lublin - Poland, September, 15-18, 2003): Program and Proceeding – Lublin, 2003. - P.312.
4. Настасієнко Н.С., Місчанчук Б.Г., Галаган Н.П. Мас-спектрометричне дослідження терміну сорбиту та ксиліту. Хімія, фізика та технологія поверхні: Між від. зб. наук. пр. / Ін-т хімії поверхні ІНП України. Гол. ред. О.О. Чуйко - К.: Вид. дім «КМ Академія», 2004. – Вип.10. – С. 198 – 201.
5. Власенко В.В. Дослідження фоточутливості одноклітинних рухливих мікроорганізмів методом доплерівської спектроскопії // Доповіді НАНУ. 2004. №4. - С. 159 – 164.
6. Craig T., Hallet F., Nickel B. Quasi-elastic light-scattering spectra of swimming microorganisms. Rotational and Translation effects // Biophys. J. – 1979. Vol. 28 – P. 457 – 472.
7. Власенко В.В. Исследование вращательно поступательного движения сперматозоидов методом доплеровской спектроскопии: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Киев, 1990. – 20 с.
8. Немировский Л.С., Соловьев И.Г., Лямов С.В. Высокая скорость активации клеток // Доклады РАН. 1992. 326, № 1.- С. 184-188.
9. Шиян А.А. Способ определения функционального состояния популяции клеток диффузией // Биофизика. 1999. Т.44, №6. - С.1063-1067.
10. Gun'ko V., Klyueva A.V., Levchuk Y.N., Leboda R. Photon correlation spectroscopy investigations of proteins // Advances in Colloid and Interface Science. 2003. 105. – P. 201-328.