

Физико-химические процессы восстановления кислорода на поверхности металлов в биомедицине

П.Н. Пилипенко

Московский физико-технический институт (государственный университет)

Развитие нанотехнологий привлекает исследователей к изучению биологической активности металлических наночастиц [1]. Особый интерес представляют, их бактерицидные свойства [2], а также токсическое действие на злокачественные опухоли [3]. В этой связи, ключевым является вопрос о механизмах биологического действия металлов. Долгое время, многие исследователи указывали лишь на биологическую активность металлов в ионной форме, изучая их токсическую или биогенную роль, и практически не рассматривали физико-химические процессы, сопровождающие окисление металлов. Одним из таких процессов является восстановление кислорода с образованием активных форм – радикалов, полиокисей водорода (H_2O_4 , H_2O_3) и перекиси водорода (H_2O_2), обладающих чрезвычайной токсичностью, а также сигнальным действием [4]. В последнее время, именно с образованием активных форм кислорода (АФК) на поверхности металлических наночастиц связаны попытки объяснить их уникальные биологические свойства [5, 6]. Данная работа посвящена изучению процессов восстановления кислорода на поверхности металлов и обсуждению их медико-биологических аспектов.

Литература

1. Глуценко Н.Н., Богословская О.А., Ольховская И.П. Физико-химические закономерности биологического действия высокодисперсных порошков металлов // Химическая физика. – 2002. – Т.21, №4. – С.79–85.
2. Ruparelia J.P., Chatterjee A.K., Duttagupta S.P., Mukherji S. Strain specific city in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles // Acta Biomaterialia. – 2008. – V. 4. – P. 707–716.
3. Жукова Г.В., Горошинская И.А., Шихлярова А.И., Кум О.И., Качесова П.С., Положенцев О.Е. О самостоятельном действии металлосодержащих наночастиц на злокачественные опухоли // Биофизика. – 2016. – Т.61. – вып.3 – С. 558–575.
4. Klyubin, I.V., Kirpichnikova, K.M., Gamaley, I.A. Hydrogen peroxide-induced chemotaxis of mouse peritoneal neutrophils // European Journal of Cell Biology. – 1996. – V. 70, №4. – P. 347–351.
5. Shi M., Kwon H.S., Peng Z., Elder A., Yang H. Effects of Surface Chemistry on the Generation of Reactive Oxygen Species by Copper Nanoparticles. // ACS Nano. – 2012. – March 27. – V.6, N 3. – P. 2157–2164.
6. Пилипенко П.Н., Мгарь Д.А., Христиченко А.Ю. Образование активных форм кислорода как основная причина бактерицидной активности наночастиц меди // Нанотехнологии и охрана здоровья. – 2014. – №4. – С. 26–30.
7. Гурвич А.А. Проблема митогенетического излучения как аспект молекулярной биологии // Издательство «Медицина», Ленинградское отделение. – 1968. – С. 240.

Материалы и методы. Для определения концентрации H_2O_2 в водных растворах использовали метод усиленной хемилюминесценции в системе пара-йодфенол-люминол-пероксидаза хрена. Образование H_2O_4 оценивали по интенсивности люминесценции возникающей при добавлении исследуемого раствора к щелочному раствору люминола. Биологическую активность коллоидных растворов наночастиц металлов и физиологического раствора при контакте с медной пластиной определяли с помощью суспензии люминесцентного штамма бактерии *E. coli* (препарат «ЭКОЛЮМ», ЗАО «НВО ИММУНОТЕХ»). Интенсивность люминесценции измеряли с помощью хемилюминометров «Биотокс-7» и «Lum5773» (РФ).

Результаты и обсуждения. В ходе работы измерены скорости образования H_2O_2 при контакте физиологического раствора с поверхностями меди, железа, алюминия, серебра и титана. Оказалось, что в случае титана значения скорости значительно меньше чем для остальных. Это хорошо согласуется с фактом гипоаллергенности титановых сплавов, чем обусловлено их использование в имплантологии. На основании полученных данных сделано предположение, что скорость образования H_2O_2 является одним из факторов определяющем иммунный ответ организма на имплантат, поскольку известно [4], она служит сигнальной молекулой H_2O_2 хемотаксиса и активации иммунных клеток.

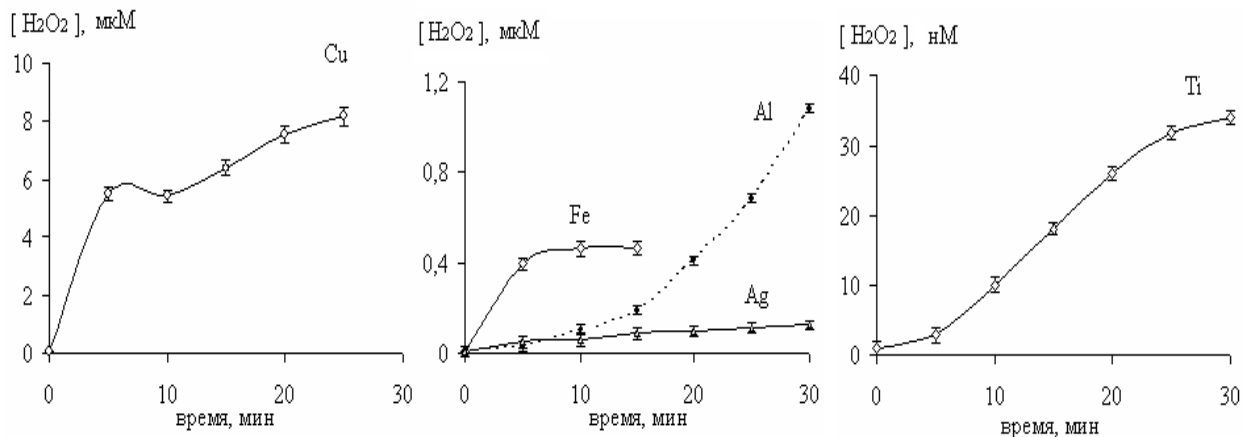


Рис.1 Кинетики образования H_2O_2 в 20 мл фосфатно – солевого буферного раствора с рН=7.4 и $[O_2] = 7$ мг/л при контакте с металлическими пластинами площадью 32 cm^2 .

Кроме того, изучено влияние ионного состава растворов, концентрации кислорода и антиоксидантов, на процессы образования АФК при контакте с металлами, а также показана роль пассивации их поверхности.

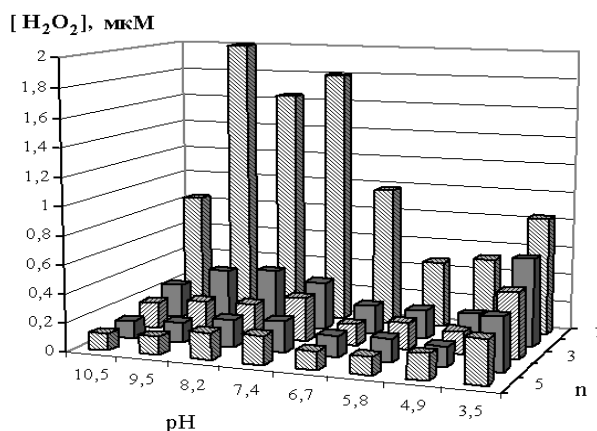


Рис.2 Зависимость образования H_2O_2 в фосфатно-солевом растворе от рН и числа инкубирований титановой пластины после шлифовки ($V=15$ мл, $S= 32 \text{ cm}^2$, $[O_2]=7$ мг/л, 20 мин – время каждого инкубирования, абсолютная погрешность определения концентрации H_2O_2 в каждом опыте не превышала величины 0.04 μM).

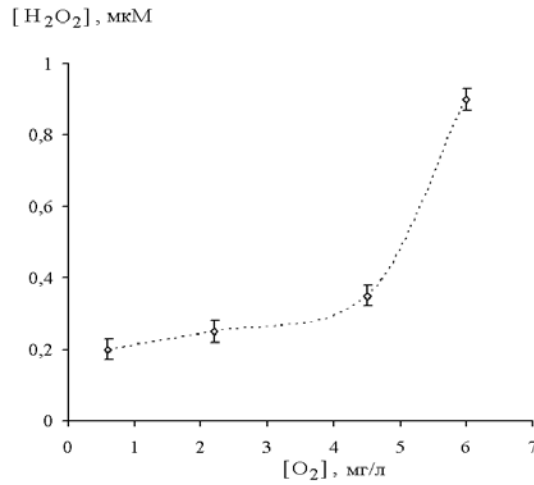


Рис. 3 Зависимость образования H₂O₂ от [O₂] в фосфтно-солевом буферном растворе после инкубирования медной пластины.

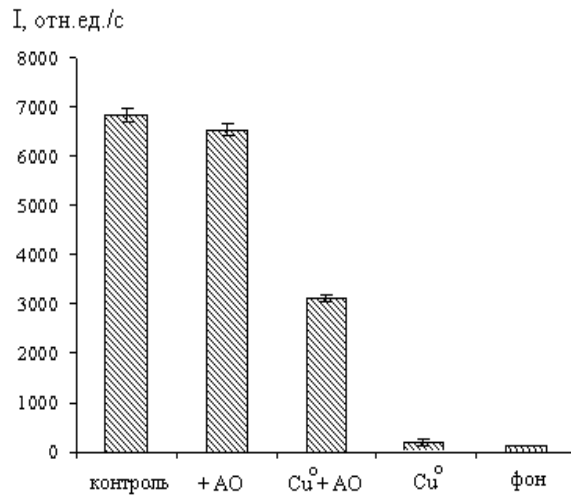


Рис.4 Интенсивность люминесценции суспензии светящегося штамма *E.coli* после 15 минут инкубирования с медной пластиной (V=20 мл, pH=7.4, [O₂]=7 мг/л, S= 12,5 см²).

Предложена схема образования АФК, включающая водородную и кислородную деполяризацию поверхности металлов, образование первичных радикалов, малоустойчивой полиокси водорода и конечного относительно стабильного продукта H₂O₂.

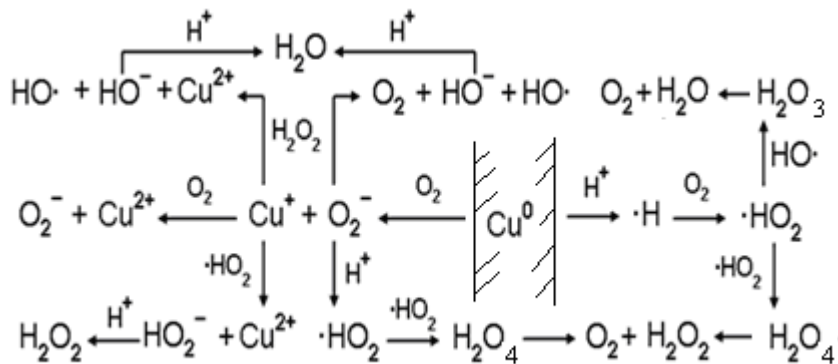


Рис.5 Реакции образований АФК на поверхности металлической меди.

Предложена уникальная методика экспрессной оценки биосовместимости металлических сплавов и пути поиска новых материалов с повышенной биосовместимостью.

Для стандартизации экспериментальных данных получаемых для металлических образцов разной формы и площади предлагается рассчитывать показатель кислородной инертности поверхности материала или готового имплантата по следующей формуле:

$$pI_o = - \lg (V \cdot \Delta C / S \cdot \tau) - 8 \quad (1)$$

где V – объём буферного раствора (л), ΔC – изменение концентрации перекиси водорода в буферном растворе (моль/л), S – площадь поверхность металлического образца (см²), τ – время инкубирования (мин).

В качестве примера приведем расчет по формуле (1) показателей кислородной инертности металлов (Таблица 1.), исследованных в описанном выше опыте, результаты которого были представлены на рис.1. В расчетах использовали значения концентрации перекиси водорода образующейся через 15 минут контакта металлических пластин с раствором фосфатно-солевого буфера. Концентрация перекиси водорода в исходном буферном растворе составляла величину ~ 1 нМ.

Таблица 1.

<i>Me</i>	$\Delta C \text{ H}_2\text{O}_2$	pI_o
<i>Cu</i>	6.33 мкМ	1.58
<i>Fe</i>	0.47 мкМ	2.70
<i>Al</i>	0.20 мкМ	3.06
<i>Ag</i>	82 нМ	3.47
<i>Ti</i>	17 нМ	4.15

Из данных таблицы видно, что значения показателя кислородной инертности практически всех металлов укладываются по удобной пятибалльной шкале (от 1 до 5), согласно которой, чем больше значение pI_o , тем выше кислородная инертность исследуемого металла.

В опытах с наночастицами меди показана их более высокая токсичность по отношению к бактериям *E. coli* по сравнению с эквивалентными концентрациями Cu^{2+} . Установлено, что это различие нивелируется присутствием антиоксиданта – пероксидазы хрена.

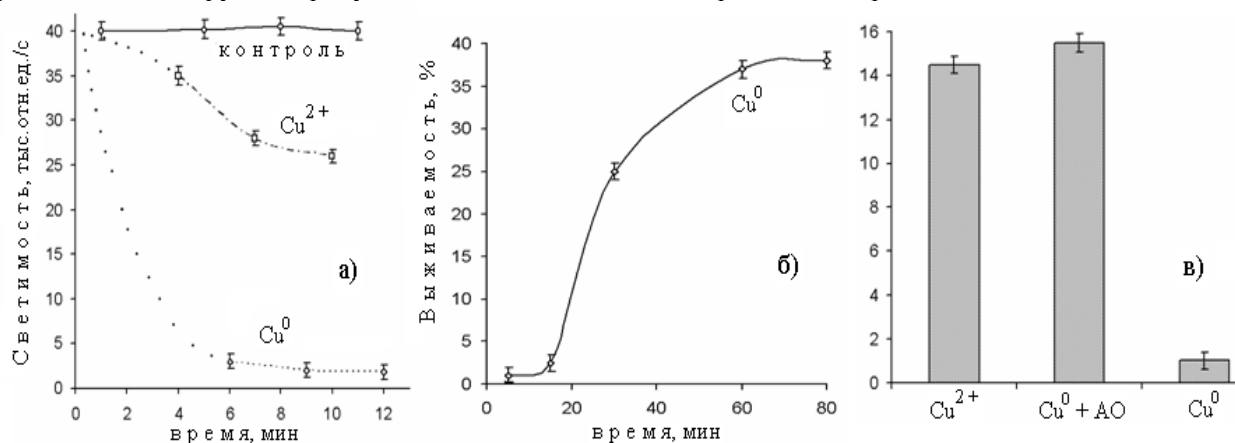


Рис.6 Действие 100 мкМ растворов CuSO_4 и наночастиц меди (Cu^0) на светящийся штамм бактерии *E. coli*: а) кинетики светимости суспензий бактерий, б) в зависимости от времени после приготовления раствора наночастиц, в) в присутствии антиоксиданта (АО).

Это на наш взгляд указывает на ключевую роль процесса восстановления кислорода на поверхности наночастиц в реализации их бактерицидного действия. Также, изучены концентрационные зависимости образования H_2O_2 в коллоидных растворах наночастиц меди и их бактерицидности.

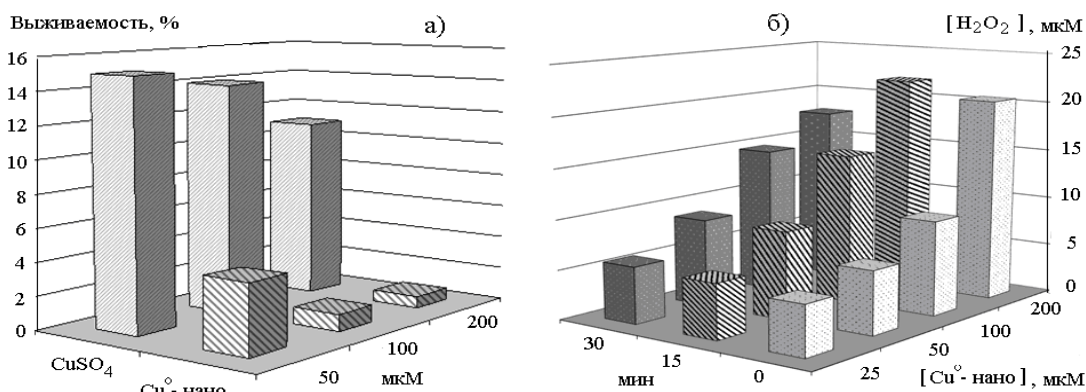


Рис.7 Концентрационные зависимости: а) выживаемости бактерий *E. coli* через 30 мин культивирования в изотонических растворах NaCl содержащих CuSO₄ или наночастицы меди, б) кинетики образования H₂O₂ в изотонических растворах с наночастицами меди.

При изучении механизма образования АФК было обнаружено, что в присутствии фосфат-ионов зависимость концентрации H₂O₂ от pH раствора имеет ярко выраженный максимум в области нейтральных значений.

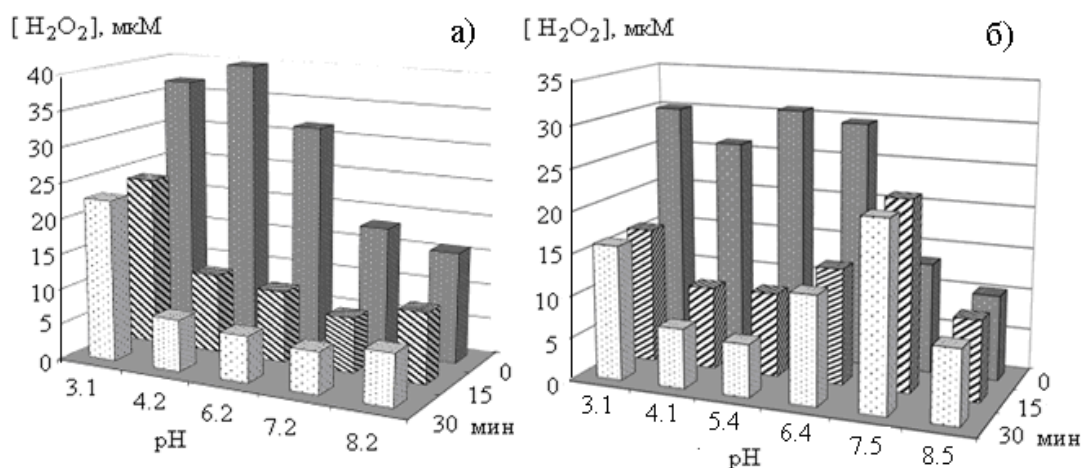


Рис.3 Образование H₂O₂ в растворах с концентрацией меди 100 μM в виде наночастиц: а) – кинетическая зависимость концентрации H₂O₂ от pH, б) в присутствии 2 мМ фосфат ионов.

Данный факт, кажется нам особенно интересным, поскольку фосфат-ионы являются одними из основных буферных ионов физиологических жидкостей многих организмов, образуют поверхность любой фосфолипидной мембраны, а также входят в состав всех нуклеиновых кислот.

В заключении следует отметить, что рассмотренные здесь окислительно-восстановительные процессы не ограничиваются лишь молекулярными воздействиями на живые системы. Данные радикальные реакции, а также реакции окисления органических соединений (белков, липидов и углеводов) сопровождаются излучением в УФ – диапазоне. Ещё в начале 20 века Гурвичем А.Г. было обнаружено [7], что первым фазам деления клеток предшествует излучение в диапазоне 200-300 нм, названное автором – *митогенетическим*. Тогда была показана его сигнальная роль в управлении деления клеток нормальных и малигнизирующихся тканей.

Таким образом, изучение физико-химических процессов восстановления кислорода на поверхности металлов позволяет в более полной мере определить медико-биологические свойства металлических наночастиц.

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ !