

PACS numbers: 81.16.Fg, 82.39.Wj, 82.70.Dd, 87.16.dp, 87.16.Uv, 87.16.Vy, 87.85.Qr

Коллоидно-биохимический механизм взаимодействия клетки с микро- и наночастицами

З. Р. Ульберг, Т. Г. Грузина, А. С. Духин

*Институт биокolloидной химии им. Ф. Д. Овчаренко НАН Украины,
бульвар Академика Вернадского, 42,
03680, ГСП, Киев-142, Украина*

Представлены данные экспериментальных и теоретических исследований коллоидно-биохимического механизма взаимодействия живых биологических клеток с микро- и наночастицами металлов. Продемонстрировано несколько независимых экспериментальных доказательств того, что случаи этих взаимодействий могут сильно зависеть от клеточного метаболизма и работы ионных насосов. Эта зависимость проявляется на очень больших расстояниях (мкм) между частицами и клеткой. Существует также дополнительный механизм взаимодействия, который вызывает обратимую агрегацию наночастиц с некоторыми живыми клетками. Этот механизм зависит от функционирования ионных насосов. Обсуждаются несколько различных теоретических моделей, объясняющих эти явления.

Представлено дані експериментальних і теоретичних досліджень колоїдно-біохімічного механізму взаємодії живих біологічних клітин з мікро- і наночастичками металів. Продемонстровано кілька незалежних експериментальних доказів того, що випадки цих взаємодій можуть сильно залежати від клітинного метаболізму та роботи йонних насосів. Ця залежність виявляється на дуже великих відстанях (мкм) між частинками та клітиною. Існує також додатковий механізм взаємодії, який спричиняє оборотню агрегацію наночастинок із деякими живими клітинами. Цей механізм залежить від функціонування йонних насосів. Обговорюються декілька різних теоретичних моделей, що пояснюють ці явища.

The colloid–biochemical mechanism of the interaction between live biological cells with microparticles and nanoparticles of metals is studied experimentally and substantiated theoretically. As shown, there are several independent lines of experimental evidence to suggest that cases of these interactions may strongly depend on the cell metabolism and ion pumps. Such dependence manifests itself at very large distances, on scale of microns, between particles and a cell. There is also an additional interaction mechanism that causes reversible aggregation of nanoparticles with some live cells. The functioning of ion

pumps controls this mechanism. The relationships between the transmembrane potential and electrokinetic potential, which are experimentally observed by cell electrophoresis and should be taken into account when the Derjaguin–Landau–Verwey–Overbeek (DLVO) electrostatic component is important, unfortunately cannot explain these peculiar phenomena. On the other hand, there is experimental evidence that nanoparticles affect cell metabolism, and this effect depends on the particle size. This one might be related to another observation that gold nanoparticles penetrate inside the cells that allows them to interact with functions of cells' organelles. Fourth different theoretical models have been suggested over the last four decades to explain these phenomena. We are very sceptical about microdielectrophoresis model due to nonlinear nature of underlying effect that leads to very high energy requirements. Another model, namely microdiffusiophoresis, seems to be more suitable in explaining the observed long-range interaction because the underlying effect is linear with the driving force, bringing substantial energy saving in comparison with the first model. The third model of 'ion pump electroosmotic trap' provides the desirable explanation of the role of ion pumps in reversible interactions with nanoparticles. Preliminary estimates indicate that reasonable values of the involved parameters could justify the sufficient energy necessary for the efficient functioning of such a trap. There is observation of similar electrohydrodynamical circulation with the same spatial symmetry near the ion exchange membrane when electric current passes through it.

Ключевые слова: микродиэлектрофорез, микродиффузиофорез, наночастицы, трансмембранный потенциал, биоспецифический механизм, взаимодействия дальнего радиуса действия, клеточный метаболизм.

(Получено 29 июля 2014 г.)

1. ВВЕДЕНИЕ

Характерной чертой развития современного естествознания последнего десятилетия является интенсификация исследований биологических систем с позиций коллоидной химии. Изучение свойств и состояний биологических клеток при их взаимодействии с ультрадисперсными минеральными частицами микро- и наноразмеров составляет одну из приоритетных задач. Чрезвычайно важным импульсом таких исследований послужило зарегистрированное 30 лет назад Открытие № 361 от 20.12.1990 г как фундаментальное природное «Явление избирательной гетерокоагуляции минеральных коллоидных частиц с микроорганизмами» (его авторами являются Ф. Д. Овчаренко, Н. В. Перцов, З. Р. Ульберг, В. Р. Эстрела-Льопис, Б. С. Коган) [1].

За прошедшие годы был выполнен большой комплекс экспериментальных и теоретических исследований, которые определили основные биохимические процессы, лежащие в основе явления избирательности, а также особенности его проявления в природе и

практические следствия [2–4]. Полученные результаты позволили сформулировать понятие металлофильности биологической клетки как генетически детерминированное свойство, отражающее систему взаимодействий клеток с микро- и наночастицами минеральной природы. Такие взаимодействия включают: (1) способность клеток аккумулировать, в том числе и селективно, металлы в количествах, значительно превышающих таковые в окружающей среде; (2) свойство металлорезистентности клеток микроорганизмов; (3) неспособность клеток микроорганизмов развиваться на средах, лишённых определённых металлов.

В изучении природы избирательности определена роль структурного и метаболического фактора во взаимодействии клетка-частица. Доказано, что особенности химического строения клеточной поверхности обуславливают различия в способности концентрировать частицы живыми клетками, тогда как особенности протекания метаболических энергопреобразующих процессов контролируют вариабельность в величине аккумулирующей активности клеток одного вида.

Полученные закономерности взаимодействия клеток с частицами металлов и минералов были успешно использованы при разработке ряда биотехнологических процессов извлечения благородных металлов, главным образом золота, из руд [5, 6]. В таких технологиях в качестве высокоселективных флокулянтов и сорбентов применяли интактные клетки микроорганизмов. Клеточные окислительно-восстановительные реакции составили основу технологий биохимического разложения особо токсичных реагентов (цианистых соединений), используемых в золотодобывающей промышленности [7, 8].

В последние годы полученные ранее фундаментальные результаты нашли успешное применение в области *наномедицины* и *нанофармации*. Наиболее существенные результаты были достигнуты при создании векторов доставки лекарственных препаратов, в том числе кардиотропных, в клетки-мишени с использованием наночастиц металлов определённой природы и размера [9, 10]. Особый интерес вызывает обнаруженная высокая терапевтическая эффективность самих наночастиц, прежде всего, как антимикробных агентов при лечении особо опасных инфекционных заболеваний [11, 12].

Фиксация ультрадисперсных частиц металлов клеткой происходит с использованием нескольких механизмов. Полученные нами результаты позволяют выделить два основных механизма концентрирования, имеющих принципиальные особенности: (1) пассивная локализация металлов за счёт электростатических, координационных и других типов связывания металлов структурными компонентами клеточной мембраны и (2) метаболизмзависимая аккумуляция металлов, которая присуща исключительно живым объек-

там, и связана с функционированием ферментных систем клетки, обеспечивающих обмен веществ и энергией с внешней средой. В этом плане впервые был определён и исследован механизм энергозависимого и избирательного накопления металлов прокариотическими и эукариотическими клетками [13, 14].

Определяющими показателями этих процессов являются электроповерхностные свойства клеток и клеточных суспензий и соответствующие коллоидно-химические процессы: коагуляция микробных клеток; электрофорез и диффузиофорез клеток; сорбция клетками ионов металлов; гетерокоагуляция клеток и минеральных частиц. В коллоидной химии для их описания имеются хорошо разработанные теории, которые дают вполне удовлетворительные результаты. В то же время при переходе к живым клеткам микроорганизмов, по крайней мере, две группы экспериментальных данных не находят разумного объяснения.

К ним относятся различия в поведении интактных и инактивированных клеток в суспензиях и в растворах электролитов, в частности по количеству аккумулируемого металла и чётко выраженной избирательности взаимодействия клеток определённого вида микроорганизмов с теми или иными металлами [15–16]. Были установлены экспериментальные факты, свидетельствующие о том, что особенности химического строения поверхности клеток играют важную, но не решающую роль в этих явлениях [9, 17]. Выполненные нами оценки показали, что теория Дерягина–Ландау–Фервея–Овербека (ДЛФО) достаточно адекватно описывает поверхностные взаимодействия в суспензиях инактивированных клеток [18]. В случае же интактных клеток и минеральных частиц требуется дополнительный учёт факторов, связанных, в первую очередь, с неравновесностью клеточной системы, обусловленной работой электрогенных клеточных насосов. Основной характеристикой неравновесности метаболизирующих клеток является трансмембранный потенциал. При этом существенной становится та его часть, которая ассоциирована с внешним двойным электрическим слоем. Механизм их действия исследован в [19, 20] и заключается в том, что энергия, высвобождаемая при окислительно-восстановительных реакциях или при гидролизе АТФ внутри клетки, затрачивается на вывод катионов, как правило, H^+ в околосклеточное пространство. Эта же часть ξ -потенциала делает этот параметр зависимым от заряда клеточной поверхности и метаболизма.

Однако в некоторых случаях это может быть недостаточным. Существуют некоторые данные, что живые клетки могут взаимодействовать с микро- и нанообъектами на расстояниях, значительно превышающих область электростатического взаимодействия в рамках теории ДЛФО. Ведущий основатель этой теории Б. В. Дерягин считал, что теория требует дополнительных механизмов для

описания взаимодействий между биологическими клетками. Эти соображения были представлены в работах [21, 22]. Дальнейшее развитие этих идей проводилось с использованием двух концепций, а именно, физической и коллоидно-биохимической, определяющих движение частиц вблизи живой клетки, адгезирование их на поверхности клетки и проникновение внутрь неё как явлений, связанных с её физиологической активностью. Так возникла необходимость создания нового *коллоидно-биохимического механизма процессов гетерокоагуляции живых клеток с коллоидными минеральными частицами в прямой зависимости от метаболизма клетки или её физиологической активности.*

2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ДАННЫЕ

Будут обсуждаться четыре главных экспериментальных факта: (1) отношение между трансмембранным и ζ -потенциалом; (2) взаимодействие клетки с частицами на больших расстояниях; (3) обратимое взаимодействие клетки с частицами золота; (4) проникновение частицы через плазматическую мембрану внутрь клетки.

Первые важные данные в развитие физической теории были получены в работах Н. Pohl. Они представлены в виде экспериментальных и теоретических моделей, описывающих процессы гетерокоагуляции клеток и частиц различной природы. Механизм, предлагаемый Pohl, для объяснения этих явлений, основан на представлениях гипотезы Frohlich о возможности генерации клеткой высокочастотного электрического поля, которое локализовано на значительных расстояниях от клетки [23, 24]. Попадающая в такое неоднородное поле частица движется за счёт диэлектро-(диполо)-фореза. При этом более полярные частицы втягиваются в максимум поля, т.е. притягиваются к клетке, а менее полярные — выталкиваются в минимум поля, т.е. не осаждаются на её поверхности. В выполненных ими экспериментах было показано удаление диэлектрических частиц титаната бария от живой клетки *Netrium digitus* с образованием вокруг неё свободной зоны (рис. 1, а). Подобные эксперименты выполнялись рядом исследователей с несколькими типами клеток и частиц (табл. 1). Эксперименты выполнялись с использованием: «техники висящей капли» и «микродиэлектрофореза». На фотографиях отчётливо видна свободная от частиц зона вокруг клетки, находящейся в центре. Зона отталкивания частиц имеет значительную протяжённость, если учесть, что размер самих частиц 2 мкм.

В это же время подобный эффект наблюдала группа Б. Дерягина и М. Голованова [21, 22]. Эти данные представлены на рисунке 1, б. Они демонстрируют образование свободной зоны в системе, где в центре находятся клетки эритроцитов, а в качестве частиц представлены частицы Индианских чернил. Аналогичные данные были

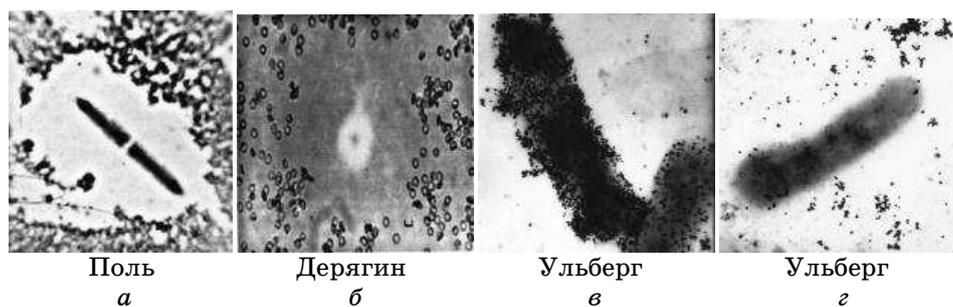


Рис. 1. Фотографии, демонстрирующие взаимодействие клеток с частицами: *a* — клетки *Netrium digitus* в присутствии частиц титаната бария [50, 52]; *б* — клетки эритроцитов (раковой опухоли) в присутствии частиц Индианских чернил [21, 22]; *в* — клетки *Bacillus cereus* в присутствии наночастиц золота; *г* — клетки *Bacillus sp.* в присутствии наночастиц золота.

получены в экспериментах с раковыми клетками.

Позднее на Украине подобные работы были выполнены в Инсти-

ТАБЛИЦА 1. Типы интактных клеток и дисперсных минеральных частиц, исследуемых в процессах их взаимодействия.

№ п/п	Авторы	Клетки	Частицы
1		Synchronized-phase <i>Bacillus cereus</i>	$BaTiO_3$
2		Yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	$NaNbO_3$
3		Rapidly-dividing fetal mouse fibroblasts	$BaSO_4$
4	группа Pohl [49–52]	Mouse ascites tumor cells (sarcoma)	Al_2O_3
5		Nucleated mouse erythrocytes.	
6		African green monkey kidney lines.	
7		feline lung line	DPIA-high
8		Algae <i>Netrium digitals</i> and <i>Closterium acerosum</i>	permittivity
9		African clawed frog fertilized eggs	
10	Derjaguin	Blood leukocytes	
11	Golovanov [20, 21]	Immunocompetent tissue cells	Ink particles
12		Tumor tissue cells	
13		<i>Bacillus cereus</i>	
14	группа Ul'berg [43–45]	<i>Bacillus fascidiosus</i>	Gold particles
15		<i>Bacillus subtilis</i>	
16		<i>Pseudomonas iodinum</i>	
17		<i>Chlorella vulgaris</i>	

туте биокolloидной химии НАНУ группой Э. Ульберг [25, 26, 28–30]. Главный феномен, который был положен в основу этих исследований, состоял в том, что процесс взаимодействия живой клетки и минеральных частиц селективен. Например, было показано при исследовании взаимодействия клеток с наночастицами золота, что одни клетки образуют вокруг себя свободную зону от частиц, в то время как другие клетки активно гетерокоагулируют с ними (рис. 1, в, г). Более того, было показано прямыми экспериментами, что существует определённая селективность во взаимодействии клеток одного вида в отношении минеральных частиц различной природы. Исследовалось движение частиц различной природы вблизи клеток микроводоросли *Chlorella vulgaris*, иммобилизованных на плоскости, в зоне с радиусом 40 мкм. Наряду с броуновским движением наблюдался и был измерен направленный перенос частиц золота, $\text{Fe}(\text{OH})_3$, SiO_2 вдоль вектора, перпендикулярного плоскости с иммобилизованными клетками. Фиксировалась средняя скорость частиц на протяжённости 25–35 мкм от плоскости. Отрицательно заряженные частицы золота и частицы $\text{Fe}(\text{OH})_3$ с положительным зарядом двигались к иммобилизованным отрицательно заряженным клеткам со скоростью V_{edf} соответственно $5 \cdot 10^{-5}$ см/с. В то же время частицы кремнезёма SiO_2 двигались в противоположном направлении от плоскости с клетками со средней скоростью $20 \cdot 10^{-5}$ см/с. В отличие от предлагаемой для объяснения наблюдаемых фактов гипотезы диэлектро-(диполо)-фореза в работах Pohl, группой Б. Дерягина была предложена теория диффузиофореза [31, 32]. Это новое электрокинетическое явление, означающее направленное движение частицы по градиенту концентрации вещества, было зарегистрировано в качестве открытия [33]. Дальнейшее развитие экспериментальных и теоретических представлений о механизме и проявлении явления диффузиофореза позволило объяснить ряд экспериментальных данных. В частности, был предложен коллоидно-биохимический механизм сверхдальнодействия на стадии направленного транспорта в эффекте селективной гетерокоагуляции микроорганизмов и минеральных частиц [34].

В отличие от работ Pohl, он учитывает способность интактной клетки выделять вещества и энергию в окружающую среду, следствием чего вблизи поверхности живой клетки, в пределах гидродинамически неподвижного слоя жидкости (соизмеримого с размером клетки), всегда существует некоторый избыток продуктов обмена, экзометаболитов. Сближающаяся в процессе орто- или перикинетической коагуляции с клеткой частица попадает в этот слой, в котором имеют место несколько процессов. Во-первых, специфическая адсорбция определённых компонентов экзаметаболитов на поверхности частиц, которая определяет их свойства, и, в первую очередь, заряд частиц. Второй процесс непосредственно определяет

причину направленного транспорта. Диффузионному слою экзаметаболических в окрестности интактной клетки соответствует действующее в его пределах электрическое поле E_d диффузионного потенциала. Предложенный и экспериментально проверенный [34–36] механизм сверхдальнодействия определяется направленным диффузиофоретическим транспортом частицы в электрическом поле диффузионного потенциала клетки. Направление и скорость такого движения зависят от направления и величины поля в диффузионном слое клетки и от величины и знака частиц.

При этом два важных экспериментальных факта были обнаружены: (1) на первом этапе осуществляется обратимое адгезирование частиц на поверхности клетки и обратимое их проникновение внутрь через плазматическую мембрану; (2) обратимая агрегация становится необратимой примерно через час контакта. Обратимая агрегация частиц и клеток находится в зависимости от клеточного метаболизма и активности ионных насосов.

В последние годы независимо в разных странах были выполнены экспериментальные работы, устанавливающие корреляцию между электрокинетическим и трансмембранным потенциалом живой клетки [37–41]. В работах, выполненных в университете Хоккайдо, были измерены электрофоретическая подвижность и трансмембранный потенциал митохондрий клеток печени крыс [40]. Измерения трансмембранного потенциала выполняли по методу Либермана–Скулачёва с тетрафенилфосфониевым ТТФ-селективным электродом [19, 20, 28]. Авторы использовали несколько химических веществ, модулирующих энергетическое состояние митохондрий. В их числе: ротенон, нарушающий цепь транспорта электронов в митохондриях и ингибирующий синтез АТФ; антимицин, ингибирующий реакцию окисления убихинона в транспортной цепи электронов окислительной фосфорилизации, нарушающий образование градиента концентрации протонов на внутренней мембране, а также ингибирующий образование АТФ; цианидпотенциальный ингибитор клеточной респираторной цепи, блокирующий процесс окислительной фосфорилизации. Другие вещества выступали в роли стимуляторов биоэнергетических процессов в митохондриях: сукцинат, способствующий активизации движения электронов в транспортной цепи; глюкоза, используемая как источник энергии и активатор метаболических процессов. Результаты представляются графически на рис. 2. Они показывают полную корреляцию обоих показателей. Главный результат этих исследований состоит в том, что метаболические процессы живой клетки оказывают влияние на её поверхностные свойства. Здесь важной становится связь между электрофоретической подвижностью клетки и степенью энергизации последней. В ряде экспериментов обнаружено возрастание электрофоретической подвижности и субклеточных единиц в

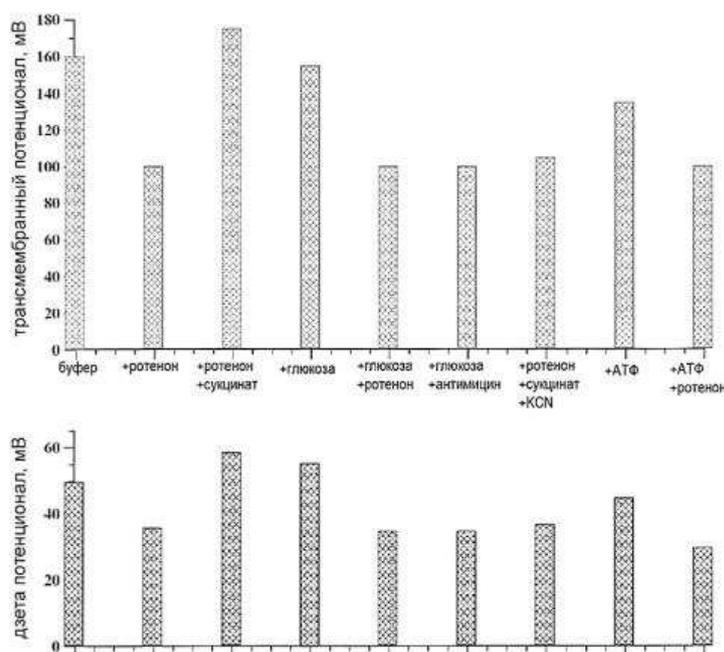


Рис. 2. Изменение трансмембранного и ζ -потенциала митохондрий клеток печени, инициируемые ингибиторами и стимуляторами биоэнергетических процессов. Рассчитаны по данным работы [40].

процессе энергизации мембраны, что сопровождается увеличением электрокинетического и трансмембранного потенциалов. К этой группе работ тесно примыкают исследования, посвящённые сравнению электрофоретических подвижностей интактных и инактивированных клеток бактерий [16, 18]. Теория биоспецифического двойного слоя интактной клетки, включающая понятие «квазиравновесного» потенциала, порождаемого процессами активного транспорта ионов через клеточную мембрану и влияющего на величину трансмембранного потенциала, развита в работах [27].

Связь электрокинетического потенциала клетки с её метаболической активностью была зарегистрирована также в работах [42]. На основании эмпирического материала ими была введена «биохимическая составляющая электрокинетического потенциала», определяемая метаболической активностью клеток, и обнаружена зависимость этой составляющей от режима работы дыхательной цепи клеток и теплового воздействия.

Экспериментальные подтверждения указанных закономерностей и развиваемой модели двойного слоя были получены в работах [4, 18], в которых измерялась электрофоретическая подвижность интактных и инактивированных клеток микроводоросли *Chlorella*

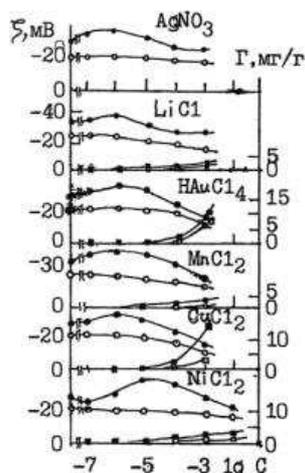


Рис. 3. Зависимость электрокинетических потенциалов (1, 2) и величин сорбции (1, 2) интактных (1, 1) и инактивированных (2, 2) клеток *Chlorella vulg.* от концентрации электролитов: AgNO_3 , LiCl , HAuCl_4 , MnCl_2 , CuCl_2 , NiCl_2 .

vulg., а также величины сорбции металлов в растворах электролитов. Ранее было показано, что процесс аккумуляции клетками наночастиц металлов качественно соответствует аккумуляции их в виде ионов [43–45].

В отношении модели накопления клетками ионов металлов экспериментальные данные представлены на рис. 3 и в табл. 2. На кривых чётко просматривается разница в значениях электрокинетического потенциала и величин сорбции исследованных клеток в зависимости от их физиологического состояния, а также природы и валентности металла. Значения электрокинетических потенциалов вполне закономерно уменьшаются с ростом ионной силы раствора.

ТАБЛИЦА 2. Сорбционная способность микроводорослей *Chlorella vulgaris* (исходная концентрация электролита 10^{-3} моль/л, время контакта — 1 час).

Электролиты	Сорбционная способность клетки <i>Chlorella vulgaris</i> , мг/г	
	Интактные	Инактивированные
CuCl_2	125,0	30,4
FeCl_3	108,0	15,6
HAuCl_4	103,0	70,0
NiCl_2	35,0	9,2
MnCl_2	17,7	3,5

Согласно развиваемой теории, в этом случае также происходит снижение квазиравновесного потенциала как части поверхностного потенциала, а также наблюдается прямая корреляция между величиной трансмембранного потенциала и аккумулярующей способностью. Чем больше абсолютная величина трансмембранного потенциала, тем с большей активностью клетки аккумулируют металл в ионной и коллоидной форме. Приведённые результаты также убедительно демонстрируют факт, что интактные клетки бактерий и микроводорослей проявляют высокую избирательность во взаимодействии с металлами.

Феномен формирования биоспецифического двойного слоя живой клетки, определяющий накопление ультрадисперсных частиц на поверхности и внутри клетки, потребовал теоретического анализа. В молекулярной биологии клетки обычно допускается, что трансмембранный потенциал полностью ассоциирован с мембраной, заряженной как конденсатор. Это утверждение справедливо при высокой ионной силе раствора, что приводит к сжатию дебаевского слоя до величины 1 нм, например, при ионной силе раствора 0,15 М. В этом случае все делокализованные, электрические заряды, выделяемые через ионные каналы из клетки в околоклеточный раствор, остаются в очень тонком слое на клеточной поверхности. Термическое движение ионов в этом случае незначительно.

Эта ситуация изменяется при уменьшении ионной силы раствора. Толщина диффузного слоя или протяжённость дебаевского слоя увеличивается. Другими словами, живые биологические клетки генерируют дополнительный электрический заряд за счёт катионов, распределённых в достаточно протяжённом двойном электрическом слое. Этот эффект был определён как «биоспецифический механизм образования двойного электрического слоя живой клетки» [4, 27]. В основе её лежит утверждение, что трансмембранный потенциал распределён между тремя конденсаторами. Один конденсатор есть сама мембрана C_m . Другие два конденсатора DL_s , C_{dl} отнесены к внутренней и внешней поверхности мембраны. Эта теория также принимает в расчёт, что изменение трансмембранного потенциала ΔU , может изменить заряд поверхности, $\Delta\sigma$, благодаря конформационным изменениям мембранных протеинов. Это позволило прийти к простому выражению для изменения ξ -потенциала ($\Delta\xi$), которое имеет место, когда трансмембранный потенциал изменяется на величину ΔU :

$$\Delta\xi = \frac{\Delta\sigma}{C_{dl} + C_m} + \frac{\Delta UC_m}{C_m + C_{dl}} \quad (1)$$

При высокой ионной силе раствора второй член этого уравнения становится незначительным. Главный вклад в изменение поверхностного потенциала вносит реконформация мембранных протеи-

нов, которая, в свою очередь, приводит к изменению трансмембранного потенциала.

Это заключение может быть важно для биоэнергетики клетки в целом. Например, перераспределение трансмембранного потенциала в пределах двойного слоя открывает возможности для стабилизации трансмембранных электрических полей, что контролирует функции многих биосистем, включённых в мембрану. Трансмембранный потенциал становится также фактором, который в комбинации с ионной силой рН и поверхностно-активными веществами может влиять на электростатические составляющие, определяющие взаимодействие живых биологических клеток с другими объектами в рамках теории ДЛФО. Это может открыть новые возможности для исследований, в частности, в области нанотоксикологии.

Результаты по исследованию обратимого взаимодействия живых клеток с частицами золота выполнялись с гетеротрофными бактериями (табл. 1). Средние размеры частиц золота составляли 20–25 нм, электрокинетический потенциал составлял –36 мВ и зависел от рН и ионной силы раствора.

При определённых условиях некоторые бактерии аккумулировали на своей поверхности и внутри большое количество частиц золота (рис. 1, в). На рисунке 4 приведены кривые, которые характеризуют процессы контактного взаимодействия наночастиц золота с размерами 10 и 30 нм с клетками линии U937 (гистиоцитарной лимфомы). Полученные результаты позволили установить чётко выраженное влияние концентрации и размера наночастиц золота на эти процессы. Так, в диапазоне концентраций 10^{-1} – 10^{-6} кл/мл или 10^{-1} – 10^{-6} мкг металла/кл наблюдаются чётко выраженные максимумы связывания около 10^3 – 10^4 кл/мл (10^{-3} – 10^{-4} мкг металла/кл для наночастиц всего размерного диапазона частиц. Резкие изменения эф-

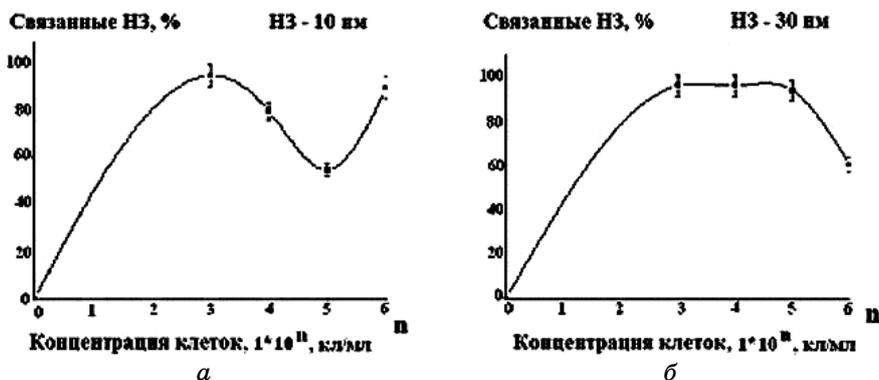


Рис. 4. Контактное взаимодействие наночастиц золота с размерами 10 (а) и 30 нм (б) с клетками линии U937.

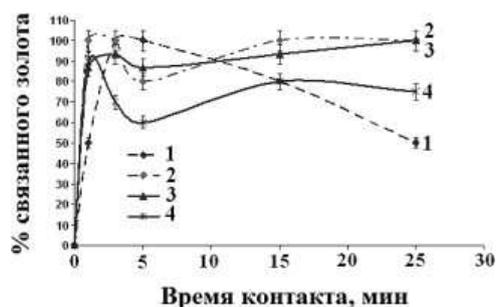


Рис. 5. Кинетика процесса контактного взаимодействия клеток линии U937 с наночастицами золота с размерами [нм]: 10 (1), 20 (2), 30 (3), 45 (4).

эффективности в аккумуляции частиц металла клетками связаны с несколькими аспектами: в области малых концентраций клеток сказывается токсическое действие металлов; в области высоких концентраций клеток влияние металла менее выражено, поверхность их свободна от металлических частиц, и более выражено взаимодействие клеток между собой. Таким образом, можно сделать вывод, что существует критическая концентрация компонентов в системе «клетка–наночастицы золота», которая определяет эффективность этого взаимодействия. По нашим данным концентрационный оптимум в исследуемой системе находится в диапазоне 0,1–1,0 нг металла/кл для частиц всех размеров частиц.

Процессы контактного взаимодействия и аккумуляции наночастиц характеризуются быстрой кинетикой: максимум связывания частиц различного размера клетками опухоли достигается в течение 3–5 мин (рис. 5). Максимальное количество адгезированных на поверхности клеток частиц, почти 100%, обнаружено в размерном диапазоне 20–30 нм, в то время как эффективность процесса для частиц с размером 45 нм составляла 80%. При аккумуляции частиц 10 нм после достижения некоторого критического значения имел место обратный эффект пептизации этих частиц обратно в раствор. Возможно, что в основе этого явления лежит механизм «efflux», который определяет способность клеток опухоли активно выбрасывать токсичные для них вещества (рис. 4, а). Этот механизм подобен противодействию опухолевых клеток химиотерапевтическим препаратам [46].

Экспериментальные данные, полученные методами конфокальной и трансмиссионной электронной микроскопии, подтверждают факт накопления частиц золота, как на поверхности клеток, так и внутри клетки (рис. 6). Наиболее выражено сродство частиц золота к клеткам линии U937 с размером 30 нм. Незначительное количество аккумуляированных частиц с размером 10 нм и сохранение целостности клетки при этом подтверждают предложенный выше

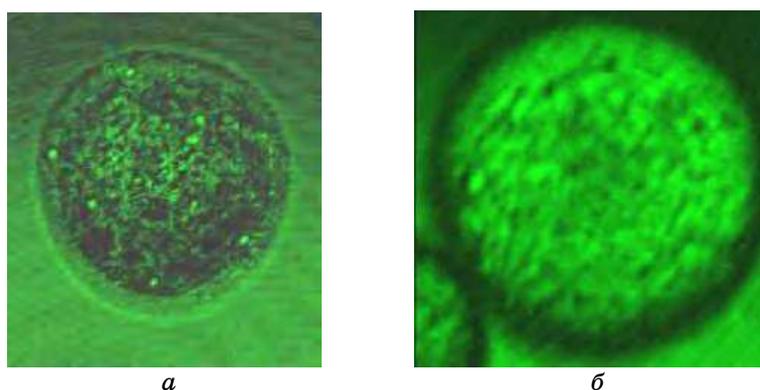


Рис. 6. Контактное взаимодействие наночастиц золота с размерами 10 нм (а) и 30 нм (б) с клетками линии U937 по данным конфокальной микроскопии (LSM510META, «Carl Zeiss», Германия).

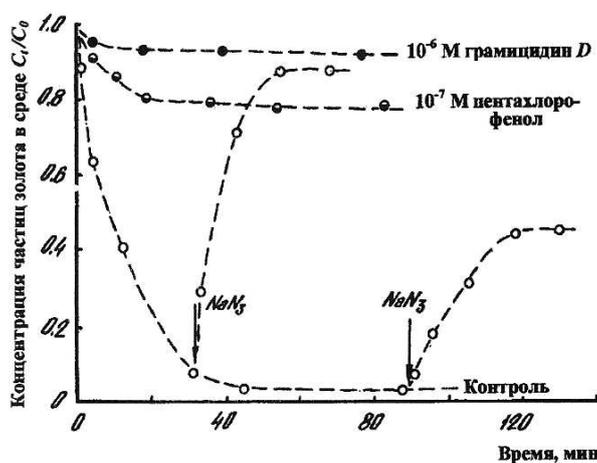


Рис. 7. Кинетические кривые, характеризующие процесс аккумуляции наночастиц золота клетками *Chlorella vulg.* при введении в систему АТФ-азы и азиды натрия.

возможный механизм «выброса» частиц из клетки. Как видно из этих данных, существуют определённые соотношения концентраций клеток и наночастиц золота, которые определяют эффективность связывания.

При определённых условиях процесс взаимодействия частиц золота с живой клеткой протекает в две стадии: вначале адгезирование частиц на поверхности происходит по электростатическому механизму, на что указывает обратимость гетерокоагуляции; необратимый процесс связывания проявляется приблизительно после часа

контакта. При этом реализуется химическое связывание металла с участием функциональных групп на поверхности клеточной мембраны, в частности, карбоксильных COO^- и тиоловых SH^- . Как уже указывалось, биохимическими важными факторами, определяющими аккумуляцию ультрадисперсных частиц золота на поверхности клетки, являются генераторы трансмембранного потенциала. Главные из них — дыхательная цепь и мембранная АТФ-аза. Деэнергизация таких клеток с помощью агентов, снижающих или устраняющих полностью трансмембранный потенциал, делает практически невозможной гетерокоагуляцию клеток микроорганизмов и частиц металла.

Первая стадия обратимой гетерокоагуляции клеток и частиц имеет свои особенности. Это процесс очень чувствителен к специфическим ингибиторам метаболизма и, следовательно, контролируется клеточным энергетическим метаболизмом. Экспериментальные данные, которые характеризуют этот процесс, приведены на рис. 7. Так, накопление металла клетками *Bacillus* sp. усиливается при введении в систему энергетического субстрата АТФ-азы и переходит в обратный процесс пептизации частиц в раствор при введении азид натрия NaN_3 — высокоспецифичного ингибитора АТФ-азы. Как показывают экспериментальные данные, такой циклический процесс может быть многократным. Рисунок 8 демонстрирует прерывание процесса аккумуляции наночастиц золота клетками *Bacillus* sp. при введении в систему пентахлорфенола, азид натрия NaN_3 , грамицидина Д. Можно видеть, что введение азид натрия приводит к выделению в раствор частиц золота, предварительно адгезированных на поверхности клетки. При этом количество пептизирующихся в раствор частиц уменьшается с увеличением времени предварительного

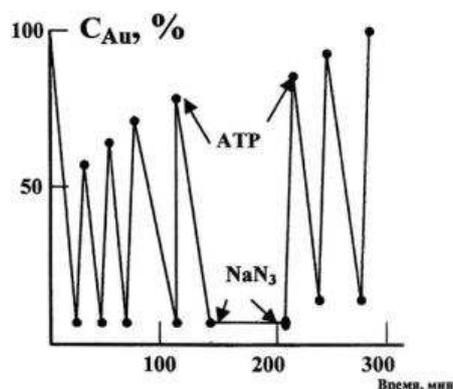


Рис. 8. Кинетические кривые, характеризующие процесс аккумуляции наночастиц золота клетками *Bacillus* sp. в присутствии азид натрия, пентахлорфенола, грамицидина Д.

контакта их с клеткой, что обусловлено переходом обратимой агрегации в необратимую. Наличие в суспензии пентахлорфеноларазобшиителя окислительного фосфорилирования и грамицидина-каналообразующего ионофора для катионов в начале процесса полностью ингибирует процесс гетерокоагуляции клеток с частицами металла. Действие азидата натрия связано с блокированием респираторной цепи клетки, введение пентахлорфенола и грамицидина приводит к полной диссипации трансмембранного потенциала за счёт нарушения синтеза АТФ-азы.

Обратимая агрегация характерна исключительно для живых клеток. Клетки бактерий, инактивированные при высоких температурах, теряют способность аккумулировать частицы металла. Аналогично, клетки микроводоросли *Chlorella vulg.* очень слабо вступают во взаимодействие с частицами золота в условиях отсутствия света. Полученные результаты свидетельствуют о том, что гетерокоагуляция интактных клеток с частицами металлов — процесс, который находится в прямой зависимости от мембранно-энергетических трансформаций. При этом важно отметить, что этот эффект наблюдается при достаточно высокой ионной силе 2,5 мМ Трис-НСI буфера, которая много выше, чем условия выполнения экспериментов группы Pohl. Это свидетельствует о том, что механизмы гетерокоагуляции клеток и микро-, наночастиц отличны от предлагаемых в этих работах.

В соответствии со сказанным выше, имеет место и обратный процесс — наночастицы золота влияют на ферментативную активность клеток. Для исследований были выбраны, используемые ранее, клетки линии U937 гистиоцитарной лимфомы человека. Исследовалось влияние наночастиц золота на мембранно-связанные ферменты Na^+ , K^+ -АТФ-азной и Mg^{2+} -АТФ-азной активности мембранной фракции этих клеток линии. Полученные результаты представлены на рис. 9. Так, наночастицы золота размером 10 нм с диапазоном концентраций 0,11–1,1 мкг/мл ингибируют ферментативную активность на 70% по сравнению с контролем (кривая 1).

Ингибирование Na^+ , K^+ -АТФ-азной активности в присутствии наночастиц золота размером 20 нм составляет 20% (кривая 2). Наночастицы золота 30 нм в диапазоне концентраций 0,11–1,10 мкг/мл уже стимулируют Na^+ , K^+ -АТФ-азную активность, а с повышением концентрации частиц до 1,1 мкг/мл увеличение показателя активности увеличивается на 30–40% (кривая 3). На 20–40% повышается Na^+ , K^+ -АТФ-азная активность в присутствии частиц с размером 45 нм (кривая 4). Таким образом, в пределах концентраций частиц золота 0,11–0,28 мкг/мл стимуляция Na^+ , K^+ -АТФ-азной активности составляет 20%. В концентрационном интервале 0,28–0,55 мкг/мл по металлу ферментативная активность увеличивается от 20 до 40% и составляет в среднем 40% при содержании

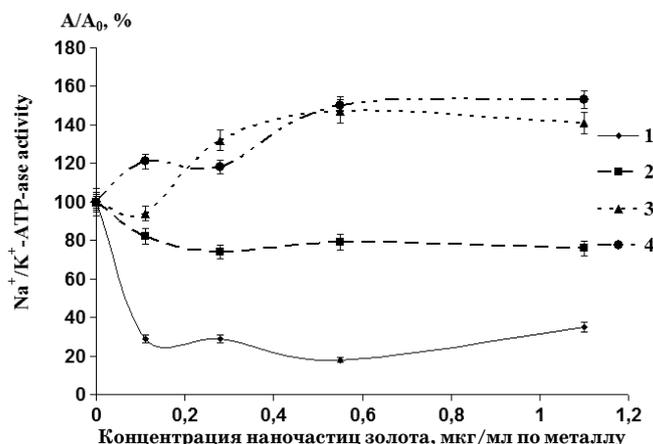


Рис. 9. Изменение величины Na^+ , K^+ -АТФ-азной активности (A/A_0) мембранной функции опухолевых клеток линии U937 в условиях действия наночастиц золота размером: 1–10 нм, 2–20 нм, 3–30 нм, 4–45 нм ($M = m$, $n = 5$, $P < 0,05$ относительно контроля — A_0 ; за 100% (контроль) взята величина Na^+ , K^+ -АТФ-азной активности при отсутствии золота).

металла 0,55–1,10 мкг/мл. Особенности влияния наночастиц золота на Na^+ , K^+ -АТФ-азную активность мембранной фракции клеток опухоли линии U937 могут быть обусловлены взаимодействием наночастиц определённого размера (вследствие стерического соответствия) с SH-группами молекулы фермента, которые отвечают за его конформационные превращения. Mg^{+2} -АТФ-азная активность мембранной фракции опухолевых клеток линии U937 в присутствии частиц золота достоверно не изменяется.

Ключевым процессом, определяющим использование наночастиц металлов в наномедицине и нанофармакологии, является проникновение частицы через плазматическую мембрану внутрь клетки, что соответствует максимальному влиянию частицы на энергетические процессы последней. Выполненные исследования показали, что в транспорте через мембрану задействованы коллоидно-химические процессы в двойном электрическом слое клетки и мембранно-связанные ферменты, ответственные за её перенос. Так, ранее нами были определены молекулярные структуры и механизмы, ответственные за перенос частиц в клетках бактерий, обладающих способностью к избирательной аккумуляции частиц золота [47, 48]. В исследованных клетках идентифицирована Mg^{+2} -АТФ-азная активность, которая состоит из двух компонент: азид-чувствительной (63%) и азид-резистентной (37%). Анализ свойств этих двух ферментных составляющих позволил сделать вывод, что азид-чувствительная АТФ-аза связана с функционированием дыхательной цепи клетки бактерий, локализованной в плазматической мем-

бране, а азид-резистентная компонента выступает как молекулярная основа трансмембранного перенесения частиц золота внутрь клетки.

3. ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ экспериментальных работ, выполненных различными группами, позволил выделить несколько стадий коллоидно-биохимического механизма гетерокоагуляции живой клетки и коллоидной частицы металла.

4. ТРАНСПОРТНАЯ СТАДИЯ

Микродиэлектрофорез. Как уже указывалось выше, представления, развиваемые Pohl о диэлектрофорезе как стадии транспорта частиц вблизи клетки, основывались на рассмотрении генерируемого клеткой высокочастотного электрического поля. Сразу следует отметить, что непосредственных измерений параметров поля эта группа исследователей не выполняла. Впоследствии были выполнены теоретические сопоставления тепловых потерь электромагнитного поля в дисперсионной среде с оценёнными по максимуму энергетическими возможностями клетки, и на основе соответствующих расчётов сделан вывод о том, такой механизм для реальных систем маловероятен [34]. Более того, напряжённость электрического поля в значительной степени зависит от природы дисперсионной среды и электрических свойств частиц. Важна также частота электрического поля. В ранних работах Pohl обозначил, что частота электрического поля должна быть 5 кГц [49–51]. В его более поздних работах высказаны предположения о том, что заряды частиц в водных растворах электролитов будут экранироваться, что делает практически невозможным генерировать низкочастотное электрическое поле за счёт движения зарядов внутри клетки [52].

Следующие оценки частоты и напряжённости электрического поля, необходимых для проявления наблюдаемых группой Pohl эффектов, были сделаны А. Духиным [3, 55] в рамках теории Максвелла–Вагнера [53–54]. Согласно этой теории, существует критическая частота, которая разделяет низкочастотную область, где доминирует ионная проводимость, и высокочастотную, где диэлектрические свойства частиц определяют поведение системы в электрическом поле. Частота W_{mw} в рамках этой теории может быть выражена формулой:

$$W_{mw} = \frac{K_m}{\varepsilon_0 \varepsilon_m}, \quad (2)$$

где K_m — проводимость среды; ε_0 и ε_m — диэлектрические ёмкости в вакууме и жидкости соответственно.

Частота генерируемого клеткой поля должна быть выше критической частоты Максвелла–Вагнера для того, чтобы предотвратить дебаевское экранирование электронных осцилляций внутри клетки. Эта высокочастотная область, определяющая возможную реализацию диэлектрофореза, зависит от диэлектрических свойств частиц и коррелирует с экспериментами группы Pohl. При такой высокой частоте скорость движения сферической частицы вблизи клетки V_{dp} равна:

$$V_{dp} = \frac{a^2 \varepsilon_0 \varepsilon_m}{3\eta} \frac{\varepsilon_p - \varepsilon_m}{\varepsilon_p + 2\varepsilon_m} \nabla E^2, \quad (3)$$

где a — радиус частицы; η — динамическая вязкость; ε_p — диэлектрическая ёмкость; ε_m — относительная диэлектрическая ёмкость в вакууме; E — напряжённость электрического поля, генерируемого клеткой. Согласно оценкам Pohl, величина напряжённости электрического поля должна превышать 15 В/см. Эта напряжённость поля может быть достигнута при осцилляции 10,8 электронов на расстоянии 1 Å или 2000 электронов для 5 мкм. Эти осцилляции не должны быть экранированы, как было сказано выше, и должны находиться в МГц-области частот. Увеличение частоты потребует больше энергии для представляемых осцилляций. Трудно представить себе, что клетка может выделить и тратить такое количество энергии.

Существует ещё один аргумент не в пользу этого механизма. Скорость диэлектрофореза, согласно уравнению (3), сильно снижается с размером частиц. Даже если можно показать, что диэлектрофоретический дрейф работает для микрочастиц, то это полностью не реально для наночастиц. Сами исследования группы Pohl и работы украинских учёных [35] показали, что для движения наночастиц потребуется поле в 10 раз сильнее. Невозможно себе представить, что клетки будут генерировать электрическое поле с напряжённостью 500 В/см.

Микродиффузиофорез. Простейшей моделью, позволяющей выявить особенности образования двойного электрического слоя и движения частиц в окрестности функционирующей клетки, может служить движение частиц вблизи растворяющегося объекта. Такой эксперимент с растворяющейся частицей стали с диаметром 1,2 мм и движением частиц кварца с размером 3 мкм был представлен в работе [56]. Теоретическая модель этого эксперимента представлена в работах [3, 33]. Приведённые в этих работах экспериментальные данные показывают, что частицы кварца и клетки бактерий образуют свободную зону вокруг растворяющейся частицы стали,

как это показано на рисунке 1, а. Механизм этого явления состоит в том, что растворение стали генерирует потоки катионов и анионов, движущихся от частицы. При этом коэффициент диффузии катионов D^+ выше, чем для анионов D^- . Соответственно, диффузионный поток катионов J_{dif}^+ будет больше, чем диффузионный поток J_{dif}^- . Схема образования электрического поля вокруг растворяющейся частицы представлена на рис. 10. Это приводит к разделению зарядов и появлению электрического поля. Это электрическое поле будет балансировать ионные потоки, делая их равными генерированием электромиграционных потоков. Электромиграционные потоки будут точно компенсировать различия в диффузионных потоках. Такие электрические поля производятся профилями концентрации электролита, что хорошо известно в электрохимии.

В этом особом случае электрическое поле будет оказывать влияние на заряженные частицы кварца. Эти частицы отрицательно заряжены, поэтому они будут уходить от центральной частицы стали. Это движение, названное «диффузиофорез», отражает тот факт, что движущая сила есть концентрация электролита. Это очень простое объяснение предложенного в [56] эксперимента и отражает главные черты явления.

Как уже указывалось, вокруг живой клетки существует диффузионный слой с повышенной концентрацией электролита за счёт обмена ионами и молекулами с окружающей средой. По аналогии с указанным процессом механизм сверхдальнодействия на частицы вблизи клетки определяется диффузиофоретическим транспортом

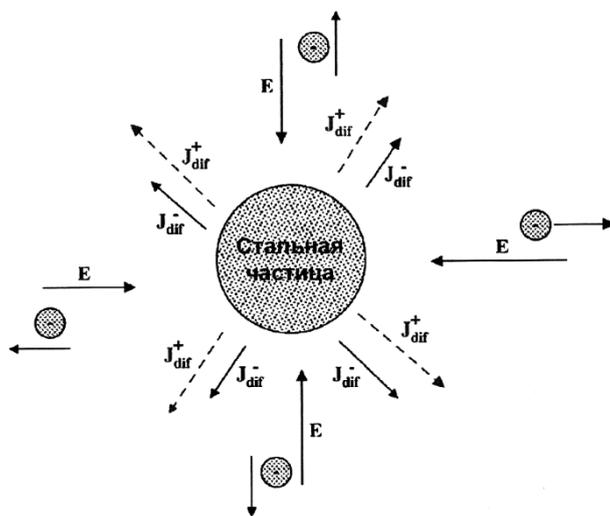


Рис. 10. Иллюстрация движения частиц кварца (размер 3 мкм) вблизи растворяющейся частицы стали (1,2 мм) [56].

их в электрическом поле диффузионного потенциала.

Простейшее выражение для скорости диффузиофореза V_{df} , которое иллюстрирует простейшую зависимость от следующих главных параметров, приведено в работах [3, 57–59]:

$$V_{df} = \frac{\varepsilon_0 \varepsilon_m \zeta}{\eta} E_{df} = \frac{\varepsilon_0 \varepsilon_m \zeta}{\eta} \frac{RT}{F} \frac{D^+ - D^-}{D^+ + D^-} \frac{\nabla C(r)}{C_0 + C(r)}, \quad (4)$$

где T — абсолютная температура; F — константа Фарадея; R — газовая константа; $C(r)$ — концентрация соли с ионами, которые диффундируют как D^+ и D^- ; C_0 — концентрация электролита, который не принимает участия в клеточно-объёмном обмене.

Выражение (4) позволяет нам оценить, например, необходимую напряжённость поля E_{df} , достигающую 10 мкм/с в модельной системе [56] и $5 \cdot 10^{-5}$ см/с по нашим измерениям. Это только 5 В/см, допуская, что ρ — потенциал частиц 25 мВ. Это на порядок меньше, чем требуется для модели микроэлектродиполофореза [46]. Этот простой факт показывает преимущество микродиффузиофореза перед микроэлектродиполофорезом.

Второй важный факт — это независимость от размера частиц. Микродиффузиофорез может функционировать для наночастиц, в то время как для микроэлектродиполофореза это невозможно.

Таким образом, направление и скорость движения частиц вблизи живой клетки зависят от направления и величины поля в диффузионном слое клетки и от заряда частиц. Последний может изменяться в зависимости от адсорбции на поверхности частицы продуктов метаболизма клетки (в том числе, экзополисахаридов) [36]. Это определяет селективность такого взаимодействия от вида и физиологической активности клетки. Так как адсорбция метаболитов, выделяемых клеткой, зависит от природы поверхности частицы, её лиофильности, а также её размера, то в результате должна проявиться селективность в агрегировании клеткой различных минеральных частиц. Такие доказательные эксперименты были выполнены [34–36]. Особый интерес представляет возможность интенсификации избирательной гетерокоагуляции путём воздействия на характер и интенсивность обменных процессов клетки с целью изменения состава внеклеточных метаболитов. Диффузионный слой внеклеточных метаболитов может оказывать влияние и в разбавленных, и в концентрированных средах. В первом случае, на стадии направленного транспорта, во втором — за счёт изменения поверхностных свойств частицы, в частности, её заряда при адсорбции биополимеров, выделяемых клеткой.

Обратимое взаимодействие наночастиц с живой клеткой. Модель «электрофоретической ловушки». Экспериментально наблюдаемая обратимость взаимодействия наночастиц с живой клеткой [4, 26, 28] была теоретически предсказана А. Духиным в [27]. Основная

концепция автора основывается на анализе активности одного ионного канала. Работа ионного канала состоит в разделении положительных и отрицательных электрических зарядов при движении делокализованных катионов через клеточную мембрану против градиента электрохимического потенциала (рис. 11, а).

В рамках очень простой модели автор оценил роль электрокинетических аспектов при функционировании ионного насоса. Делокализованные катионы не покидают полностью клеточное пространство в связи с нахождением там анионов. Эти положительные и отрицательные заряды формируют два диффузных слоя Дебая и внутри и снаружи клетки. В процессе непрерывного выделения катионов через этот насос диффузные слои распространяются тангенциально плоскости мембраны. При действии нескольких ионных насосов создаётся «биоспецифический двойной слой», описанный выше.

Уже простой анализ показывает, что ионный насос не только раз-

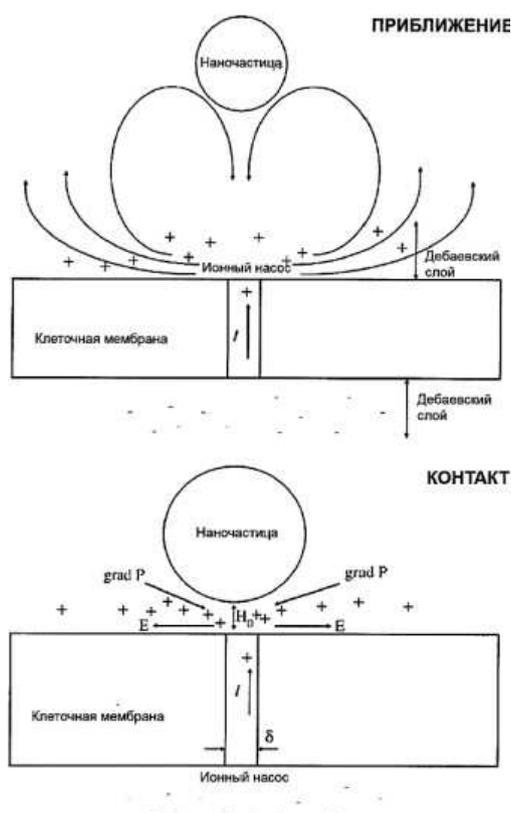


Рис. 11. Схема образования электрического поля вокруг растворяющейся частицы.

деляет электрические заряды, но он также генерирует поверхностный ток вдоль клеточной поверхности. Подобные поверхностные токи используются нейронами для передачи сигналов. Поверхностный ток включает в движение жидкость подобно хорошо известному электроосмотическому эффекту [60]. Поверхностное течение жидкости сферически симметрично вокруг выхода ионного насоса. Непрерывность течения жидкости требует, чтобы это сферически симметричное течение было сбалансировано с тангенциальным течением из объёма к центру зоны вокруг ионного насоса. И электроосмотическая циркуляция вблизи ионного насоса будет транспортировать наночастицы к вершине насоса, как это показано на стадии «притяжения» на рис. 11, а. Это есть первая стадия электроосмотического притяжения частицы. Приближение наночастицы к вершине ионного насоса, в конце концов, блокирует движение жидкости. Частица будет функционировать как затвор для гидродинамического течения, но эта ситуация не исключает электроосмотическое притяжение. Насос будет продолжать выбрасывать де локализованные катионы в пространство между поверхностью частицы и клеточной стенкой, как показано на стадии «контакта» (рис. 11, б). Тангенциальное движение катионов во внутреннем пространстве недостаточно, чтобы включить в него жидкость, так как ионный насос не может работать как фонтан. Это приводит к возникновению градиента давления, которое сбалансирует силы действующие ионами на воду. Давление между частицей и ионным насосом будет падать. Градиент давления от внешнего пространства к центру, где расположен ионный насос, будет сохранять воду в покое, компенсируя электродинамическую силу движения катионов.

При уменьшении давления между частицей и ионным каналом частица будет двигаться к поверхности клетки. Таким путём создаётся подобие «ловушки давления». Этот механизм может объяснить обратимость взаимодействия между наночастицей золота и живой клеткой *Bacillus cereus* [5, 44]. И существенным параметром в реализации этого процесса являются значения поверхностных зарядов частицы и клетки, а также время их контакта. Частица золота в броуновском движении будет приближаться к клеточной поверхности и хаотично приходить в контакт с ионным каналом. Ионный насос будет притягивать частицу к клеточной поверхности. В случае высоких поверхностных зарядов частицы и клетки этому будут препятствовать классические электростатические силы отталкивания ДЛФО в двойном слое DLs. И частица будет находиться над ионным каналом.

Если работа канала по какой-либо причине прекратится, давление в этом пространстве вернётся к нормальной величине, и частица будет высвобождаться в объём раствора. Однако чем дольше частица будет находиться над ионным каналом, тем медленнее она

будет диффундировать через ДЛФО-барьер и необратимо притягиваться к клеточной поверхности. Это объясняет тот факт, что прекращение функционирования ионного канала приводит к пептизации частиц в объем, и этот процесс реализуется во времени.

Следующий вопрос состоит в том, что достаточна ли сила этой ловушки для реализации этих эффектов. В этом направлении А. Духиным были выполнены некоторые математические оценки [3, 27]. Сделана простая предварительная оценка эффективности силы электрического поля между частицей и клеткой. Предполагалось, что ионный насос генерирует электрический ток I [Кл/с]. Этот ток может быть скомпенсирован тангенциальным током, который пересекает воображаемую плоскость вокруг вершины ионного насоса. В этих расчётах плотность электрического тока выражена как произведение проводимости K_m и напряжённости электрического поля E_{eff} следующей простой формулой для оценки величины E_{eff} :

$$I = K_m E_{\text{eff}} \pi \delta H_0. \quad (5)$$

Известно, что единичный ионный насос может осуществлять гидролиз около 100 молекул АТФ в секунду [19, 20, 61, 62]. Величина выхода для I как 10^{-17} Кл/с. Проводимость среды может быть оценена величиной 0,01 См/м (приближается к эксперименту [60]). Диаметр ионного насоса δ и ширина площади H_0 могут быть оценены как 5 нм каждый. Это позволяет определить напряжённость электрического поля как 10 В/см. Эта величина вполне достаточна для реализации электрокинетических эффектов. Эти расчёты позволяют положительно оценивать предложенную модель, демонстрирующую роль ионных насосов во взаимодействии наночастиц с живой клеткой.

Проникновение частицы сквозь плазматическую мембрану клетки. Модель электропорации как физический механизм прохождения наночастицы металла через клеточную мембрану [63]. Изучению возможностей проникновения наночастиц металлов, в частности, золота в цитоплазму живой клетки посвящено быстрорастущее число исследований на стыке биологии, медицины, химии и физики [64–67]. Существуют представления о нескольких возможных путях, по которым наночастицы могут преодолеть плазматическую мембрану и попасть внутрь клетки. При этом в зависимости от того, какой из них реализуется, положение частицы в клетке, и, соответственно, возможности его использования могут быть существенно различными. Прежде всего, эти пути различаются тем, насколько каждый из них повреждает клетку.

Первым из известных и наиболее изученных путей, по которым частица попадает из внеклеточной среды в живую клетку, является эндоцитоз [68, 69]. При эндоцитозе клеточная мембрана прогибает-

ся внутрь клетки под приблизившейся частицей, а затем, замкнувшись, образует вокруг последней вакуоль, которая вместе с заключённой в неё частицей оказывается внутри клетки, ничуть её не повредив. Правда, то обстоятельство, что помещённая в вакуоль частица не может взаимодействовать со структурами цитозоля, ограничивает возможности её использования в указанных областях [64].

Согласно современным представлениям, кроме как посредством эндоцитоза, наночастицы могут попасть внутрь клетки только с помощью достаточно сильных внешних воздействий таких, например, как ультразвук (сонопорация) [70–71] или электрическое поле (электропорация) [72], которые могут быть опасными для клетки. Например, электропорацию нельзя применять в тех случаях, когда наночастицы вводятся в живые клетки.

Разработанная В. Н. Шиловым модель проникновения наночастиц металла в клетку основана на явлении электропорации, которая вызвана не внешним полем, а ростом напряжённости электрического поля E_m в липидном бислое мембраны живой клетки, когда поблизости от её поверхности оказывается металлическая наночастица [63]. Принимается во внимание то обстоятельство, что и без внешних источников, мембрана живой клетки всегда находится под действием электрического поля. Его источником является мембранный потенциал. Существование трансмембранного потенциала, а также, то обстоятельство, что специальные структуры живой клетки поддерживают его оптимальную величину, являются ключевыми. Оценка влияния наночастицы металла на напряжённость электрического поля в мембране выполнялась на основе того факта, что электропроводность частицы намного превышает электропроводность окружающего раствора, и её поверхность будет эквипотенциальной. С учётом напряжённости электрического поля в мембране в нормальном состоянии клетки была предложена формула для оценки напряжённости электрического поля в мембране вблизи точки касания частицы:

$$E_{mg} = \frac{U - \Delta\psi_g}{h} = \frac{U - \Delta\psi_e e^{-\kappa_c a}}{h}, \quad (6)$$

где h — толщина мембраны; $\Delta\psi_e$ — потенциал частицы в точке касания с мембраной; $\Delta\psi_g$ — потенциал металлической частицы.

Из формулы (6) видно, что, если радиус частицы существенно превысит толщину дебаевской атмосферы (если $\kappa_c a > 1$), вблизи точки касания почти весь мембранный потенциал U окажется приложенным к липидному бислою. При этом напряжённость поля в нём приближается к максимальному значению U/h , при котором возможен пробой мембраны. В то же время, по мере удаления от точки касания ширина зазора между мембраной и поверхностью частицы будет возрастать, а напряжённость поля в мембране — уменьшаться.

ся, приближаясь к величине $E_m = (U - \Delta\psi_e)/h$, которая соответствует нормальному состоянию мембраны. Для расчёта зависимости напряжённости поля в мембране от расстояния до точки касания с нахождением распределения потенциала в дебаевской атмосфере для сложной геометрии зазора между сферой и плоскостью был использован метод кольцевых зон Дерягина [73]. Тогда напряжённость поля в мембране может определяться по уравнению:

$$E_m = \frac{\varepsilon_e \kappa_e (1 + e^{2\kappa_e x_g}) U + \frac{\sigma_e}{\varepsilon_0} (1 + e^{2\kappa_e x_g}) - 2\varepsilon_e e^{\kappa_e(x_g - a)} \Delta\psi_e}{\varepsilon_e \kappa_e h (e^{2\kappa_e x_g} + 1) + \varepsilon_m (e^{2\kappa_e x_g} - 1)}, \quad (7)$$

где ε_e — электростатическая индукция на наружной стороне мембраны, б.р.; ε_m — электростатическая индукция в мембране, б.р.; x_g — ширина зазора между поверхностью частицы и мембраной, нм; σ_e — плотность заряда внешней поверхности мембраны, Кл/м².

Ширина зазора между поверхностями частицы мембраны как функция расстояния r от точки касания в рамках применимости метода Дерягина выражается следующей приближенной формулой:

$$x_g \approx \frac{r^2}{2a}. \quad (8)$$

Выполненные вычисления позволили получить зависимость напряжённости поля в мембране как функцию отношения расстояния r от точки касания частицы к её радиусу, представленную на рис. 12. Как видно на рис. 12, вблизи точки касания поля в мембране напряжённость увеличивается с ростом размера частиц, при-

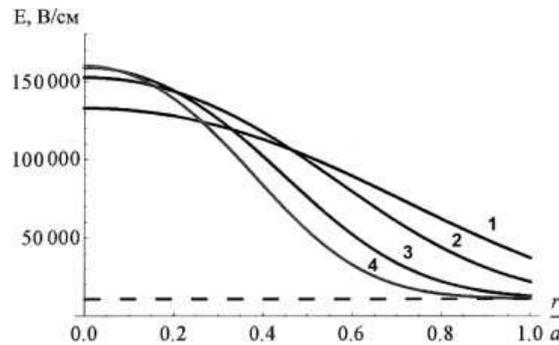


Рис. 12. Модель процесса электроосмотической циркуляции жидкости в устье функционирующего ионного насоса, определяющей адгезию частиц на поверхности клетки. (а) «Приближение» к устью насоса с последующей стадией «Контакта» для реализации взаимодействия на коротких (малых) расстояниях (б).

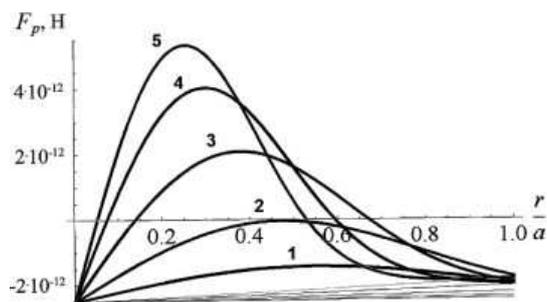


Рис. 13. Напряжённость поля в мембране как функция отношения расстояния r от точки касания частицы к её радиусу a , для пяти значений последнего: 1 — $a = 2,5$ нм, 2 — $a = 4,3$ нм, 3 — $a = 7,5$ нм, 4 — $12,5$ нм, 5 — $a = 18$ нм. Пунктир — напряжённость поля в отсутствие частицы.

ближаясь к величине $U/h = -1,6 \cdot 10^5$ В/см. По мере удаления от точки напряжённость поля уменьшается. Важно отметить выявленную закономерность: чем больше радиус частицы, тем быстрее уменьшается напряжённость поля в мембране с ростом величины r/a .

Количественное описание явления электропорации, а именно работы, необходимой для формирования поры радиуса r и силы, растягивающей контур поры F_p , на основании определяемой выше величины напряжённости поля, выполнено в работе [63] с использованием зависимостей, полученных в работах [74, 75]. Полученные данные представлены на рис. 13. При $r/a = 0$ все кривые пересекаются в одной точке ниже оси абсцисс. Это происходит потому, что при достаточно малом радиусе поры, действующая на её контур сила почти целиком определяется линейным натяжением. Отрицательный знак силы F_p означает, что, представленная сама себе, пора будет стягиваться. С увеличением радиуса поры, стягивающая её контур сила будет уменьшаться и, при достаточно большом размере частицы, например $a > 4,3$ нм, пройдя через ноль, поменяет знак и станет растягивающей силой. Это связано исключительно с ростом напряжённости поля в клеточной мембране, под влиянием осевшей на неё металлической наночастицы. По мере дальнейшего роста радиуса поры, её контур будет все сильнее удаляться от точки касания, а значит, и от поверхности частицы. При этом влияние последней на поле в мембране будет ослабевать и растягивающая контур сила F_p , пройдя через максимум, начнёт уменьшаться. Наконец, при достаточно большом радиусе поры F_p снова поменяет знак, и влияние частицы на поле в мембране резко ослабевает.

Результаты теоретических исследований полностью согласуются с полученными нами экспериментальными данными [11, 12, 14].

Таким образом, несколько независимых экспериментальных данных об особенностях взаимодействия живой биологической

клетки с микро- и наночастицами в значительной мере определяется клеточным метаболизмом и работой ионных насосов. С другой стороны, многие экспериментальные факты свидетельствуют о существенном влиянии наночастиц металлов на метаболизм клетки. Показано, что проникновение наночастиц золота внутрь через плазматическую мембрану позволяет их взаимодействие с функциональными органеллами клетки. Четыре различные теоретические модели, созданные в течение последнего десятилетия, предложены для объяснений этих явлений.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Ф. Д. Овчаренко, Н. В. Перцов, З. Р. Ульберг, В. Р. Эстрела-Льопис, Б. С. Коган, *Явление избирательной гетерокоагуляции минеральных коллоидных частиц с микроорганизмами* (Диплом на открытие № 361 Госкомизобретений СССР; гос. регистрация 20.12.1990).
2. Ф. Д. Овчаренко, З. Р. Ульберг, С. В. Гарбара, Н. В. Перцов, *ДАН СССР*, **284**: 711 (1985).
3. A. S. Dukhin, Z. R. Ul'berg, V. I. Karamushka, and T. G. Gruzina, *Advance in Colloid and Interface Science*, **159**: 60 (2010).
4. Z. R. Ul'berg, T. G. Gruzina, and N. V. Pertsov, *Nanoscience: Colloidal and Interfacial Aspects. Surfactant Science Series. Vol. 147* (Ed. V. M. Starov) (Boca Raton, FL: CRC Press: 2008), p. 269.
5. А. А. Ващенко, Л. Г. Марочко, З. Р. Ульберг, *Коллоидный журн.*, **68**, № 4: 445 (2006).
6. И. И. Волобаев, Л. Г. Марочко, З. Р. Ульберг, *Коллоидный журн.*, **74**, № 4: 454 (2012).
7. З. Ульберг, В. Подольська, *Вісник НАН України*, № 3: 14 (2011).
8. В. Э. Шпак, В. И. Подольская, З. Р. Ульберг, *Коллоидный журн.*, **57**, № 1: 108 (1995).
9. З. Ульберг, Т. Грузина, О. Карпов, *Вісник НАН України*, № 8: 28 (2008).
10. S. A. Wissing, O. Kayser, and R. H. Muller, *Advance Drug Delivery Rev.*, **56**: 1257 (2004).
11. Л. С. Резниченко, С. И. Мохнатый, Т. Г. Грузина, А. М. Воробьева, З. Р. Ульберг, *Вісник проблем біології і медицини*, **1**, вип. 3: 106 (2012).
12. О. В. Маланчук, З. Р. Ульберг, А. В. Рыбачук, Л. С. Резниченко, Т. Г. Грузина, *Доповіди НАМН України*, **18**, № 3: 384 (2012).
13. Z. R. Ul'berg, A. S. Dukhin, V. I. Karamushka, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1134**: 89 (1992).
14. И. С. Чекман, З. Р. Ульберг, В. О. Маланчук и др., *Нанонаука, нанобиологія, нанофармація* (Київ: Поліграф Плюс: 2012), с. 190.
15. З. Р. Ульберг, Л. Г. Марочко, Т. А. Полищук, Н. В. Перцов, *Коллоидный журн.*, **50**: 1026 (1988).
16. Ф. Д. Овчаренко, З. Р. Ульберг, Н. В. Перцов, *Журнал всесоюзного химического общества им. Д. И. Менделеева*, **34**, № 2: 159 (1989).
17. З. Р. Ульберг, В. И. Карамушка, Т. Г. Грузина, *Биотехнология*, **1**: 109 (1986).
18. Z. R. Ul'berg and L. G. Marochko, *Colloids and Surfaces A. Physicochemical*

- and Engineering Aspects*, **159**: 513 (1999).
19. P. Mitchell, *Biol. Rev., Cambridge Phil. Soc.*, **41**: 445 (1966).
 20. P. Mitchell, *Nature*, **191**: 144 (1961).
 21. B. V. Derjaguin and M. V. Golovanov, *Colloids Surf.*, **10**: 77 (1984).
 22. M. V. Golovanov and B. V. Derjaguin, *Colloid. J.*, **41**, No. 4: 649 (1979).
 23. H. Frolich, *Quantum Chem.*, **2**: 641(1968).
 24. H. Frolich, *Nature*, **228**: 1093 (1970).
 25. Z. R. Ul'berg, V. I. Karamushka, A. K. Vidybida, A. K. Serikov, A. S. Dukhin, T. G. Gruzina et al., *Biochimica et Biophysica Acta*, **1134**: 89 (1992).
 26. A. S. Dukhin, V. I. Karamushka, Z. R. Ul'berg, and I. G. Abidor, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **26**, No. 2: 131(1991).
 27. A. S. Dukhin, *Colloids Surf. A*, **79**: 29 (1993).
 28. V. I. Karamushka, Z. R. Ul'berg, T. G. Gruzina, and A. S. Dukhin, *Acta Biotechnol.*, **11**, No. 3: 197 (1991).
 29. В. И. Карамушка, З. Р. Ульберг, Т. Г. Грузина, *Укр. биохимический журн.*, **62**, № 1: 76 (1990).
 30. З. Р. Ульберг, В. И. Подольская, В. И. Карамушка, Н. В. Перцов, *Коллоидный журн.*, **48**, № 5: 1038 (1985).
 31. Б. В. Дерягин, С. С. Духин, А. А. Короткова, *Коллоидный журн.*, **23**, № 1: (1961).
 32. С. С. Духин, Б. В. Дерягин, З. Р. Ульберг, Т. В. Кузнецова, *Коллоидный журн.*, **40**, № 3: 464 (1980).
 33. Б. В. Дерягин, С. С. Духин, З. Р. Ульберг, Г. Л. Дворниченко, *Явление диффузофореза* (Диплом на открытие № 376 Госкомизобретений СССР; гос. рег. 21.12.1989).
 34. Ф. Д. Овчаренко, В. Р. Эстрела-Льопис, А. И. Гаврилюк, А. С. Духин, *Физико-химическая механика и лиофильность дисперсных систем* (Киев: Наукова думка: 1985), вып. 17, с. 3.
 35. Ф. Д. Овчаренко, Н. В. Перцов, З. Р. Ульберг, В. Р. Эстрела-Льопис и др., *Физико-химическая механика и лиофильность дисперсных систем* (Киев: Наукова думка: 1985), вып. 17, с. 96.
 36. В. Р. Эстела-Льопис, Ф. Д. Овчаренко, И. Н. Юркова, *Физико-химическая механика и лиофильность дисперсных систем* (Киев: Наукова думка: 1991), вып. 22, с. 1.
 37. L. L. Grinus, P. Yu. Daugelavichius, and G. A. Alkimavichius, *Biochimica*, **45**: No. 9: 1609 (1980).
 38. В. П. Скулачев, *Трансформация энергии в биологических мембранах* (Москва: Наука: 1972), с. 244.
 39. E. A. Liberman and V. P. Skulachev, *Biochimica et Biophysica Acta*, **216**: 30 (1970).
 40. L. E. Bakeeva, L. L. Grinus, A. A. Jasaitis, E. A. Liberman et al., *Biochimica et Biophysica Acta*, **216**: 13 (1970).
 41. J. Tsoneva and Tj. Topov, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **12**: 232 (1984).
 42. Т. Ф. Грифанова, *Сравнение электроповерхностных свойств и агрегативной устойчивости неорганических и биологических объектов* (Дисс. ... канд. хим. наук) (Ленинград: ЛГУ: 1985).
 43. В. И. Карамушка, А. С. Духин, Т. Г. Грузина, С. Г. Склярков, З. Р. Ульберг, *Физико-химическая механика и лиофильность дисперсных систем* (Киев: Наукова думка: 1989), вып. 20, с. 60.

44. З. Р. Ульберг, В. И. Карамушка, Ф. Д. Овчаренко, *ДАН СССР*, **303**, № 3: 738 (1984).
45. З. Р. Ульберг, В. И. Карамушка, Т. Г. Грузина, А. С. Духин и др., *Коллоидный журн.*, **52**, № 1: 172 (1990).
46. V. F. Chekhun, G. I. Kulik, O. V. Yurchenko et al., *Cancer Lett.*, **231**, No. 1: 87 (2006).
47. Г. В. Данилович, Т. Г. Грузина, З. Р. Ульберг, С. О. Костерин, *Укр. біохім. журнал*, **76**, № 5: 45 (2004).
48. Г. В. Данилович, Т. Г. Грузина, З. Р. Ульберг, С. О. Костерин, *Укр. біохім. журнал*, **79**, № 4: 46 (2007).
49. H. A. Pohl, W. T. Philips, and J. K. Pollock, *Energy Transfer Dynamics* (Eds. T. W. Barrett and H. A. Pohl) (Springer-Verlag: 1987), p. 273.
50. H. A. Pohl, *Dielectrophoresis Behaviour of Neutral in Nonuniform Electric Fields* (Cambridge: Cambridge University Press: 1978).
51. H. A. Pohl, T. Braden, S. Robinson, J. Piclardi, and D. G. Pohl, *J. Biol. Phys.*, **9**: 133 (1981).
52. H. Rivera, J. K. Pollock, and H. A. Pohl, *Cells Biophys.*, **7**: 43 (1985).
53. J. C. Maxwell, *Electricity and Magnetism* (Oxford: Clarendon Press: 1892), vol. 1.
54. K. W. Wagner, *Arch Electr.*, **2**: 371 (1914).
55. S. S. Dukhin and V. N. Shilov, *Dielectric Phenomena and Double Layer in Dispersed Systems and Polyelectrolytes* (New York: John Wiley and Sons: 1974).
56. V. A. Murtsovkin, *Experiment. Colloid J.*, **3**: 354 (1987).
57. B. V. Derjaguin and S. S. Dukhin, *Colloid J.*, **46**, No. 4: 645 (1984).
58. B. V. Derjaguin, S. S. Dukhin, and A. V. Listovnichiy, *Colloid J.*, **47**, No. 3: 480 (1985).
59. J. L. Anderson and D. S. Prieve, *Langmuir*, **7**: 403 (1991).
60. J. Lyklema, *Fundamental of Interface and Colloid Science* (London–New York: Academic Press: 1995–2000), vols. 1–3.
61. B. Alberts, J. Lewis, A. Johnson, M. Raff, K. Roberts, and P. Walters, *Molecular Biology of Cells (4th edition)* (New York: Garland Science: 2002).
62. P. Mitchell, *J. Theor. Biol.*, **62**: 327 (1976).
63. В. Н. Шилов, З. Р. Ульберг, *Коллоидный журн.*, **76**, № 5: (2014).
64. R. Lévy, U. Shaheen, Y. Cesbron, and V. Sée, *Nano Reviews*, **1**: 10.3402/nano.v1i0.4889 (2010).
65. А. И. Омельченко, *Вісник Угорського державного університету*, **2**, № 21: 40 (2011).
66. E. E. Connor, J. Mwamuka, A. Gole, C. J. Murphy, and M. D. Wyatt, *Small*, **1**: 325 (2005).
67. J. R. Morones, J. Elechiguerra, A. Camacho, K. Holt, J. B. Kouri, and J. T. Ramirez, *Nanotechnology*, **16**, No. 10: 2346 (2005).
68. G. J. Doherty and H. T. McMahon, *Ann. Rev. Biochem.*, **78**: 857 (2009).
69. S. D. Conner and S. L. Schmid, *Nature*, **422**: 37 (2003).
70. Y. Zhou, R. E. Cui, and C. X. Deng, *Ultrasound. Med. Biol.*, **35**: 1756 (2009).
71. K. Otani, K. Yamahara, S. Ohnishi, H. Kitamura, and N. Nagaya, *Control Release*, **9**: 146 (2009).
72. E. Tekle, R. Astimian, and P. B. Chock, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**: 4230 (1991).
73. Б. В. Дерягин, *Журн. физ. химии*, **6**, № 10: 1306 (1935).

74. H. Ti Tien, *Bilayer Lipid Membranes (BLM): Theory and Practice (1st edition)* (New York: Marcel Dekker, Inc.: 1974), ch. 6–7.
75. И. Г. Абидор, В. В. Аракелян, В. Ф. Пастушенко, *Докл. АН СССР*, **240**, № 3: 1306 (1978).

REFERENCES

1. F. D. Ovcharenko, N. V. Pertsov, Z. R. Ul'berg, V. R. Estrela-Llopis, and B. S. Kogan, *Yavlenie Izbiratel'noy Geterokoagulyatsii Mineral'nykh Kolloidnykh Chastits s Mikroorganizmami* (Diplom na otkrytie No. 361 Goskomizobreteniy SSSR; Gos. registratsiya 20.12.1990) (in Russian).
2. F. D. Ovcharenko, Z. R. Ul'berg, S. V. Garbara, and N. V. Pertsov, *Doklady AN SSSR*, **284**: 711 (1985) (in Russian).
3. A. S. Dukhin, Z. R. Ul'berg, V. I. Karamushka, and T. G. Gruzina, *Advance in Colloid and Interface Science*, **159**: 60 (2010).
4. Z. R. Ul'berg, T. G. Gruzina, and N. V. Pertsov, *Nanoscience: Colloidal and Interfacial Aspects. Surfactant Science Series. Vol. 147* (Ed. V. M. Starov) (Boca Raton, FL: CRC Press: 2008), p. 269.
5. A. A. Vashchenko, L. G. Marochko, and Z. R. Ul'berg, *Kolloidnyi Zhurn.*, **68**, No. 4: 445 (2006) (in Russian).
6. I. I. Volobaev, L. G. Marochko, and Z. R. Ul'berg, *Kolloidnyi Zhurn.*, **74**, No. 4: 454 (2012) (in Russian).
7. Z. Ul'berg and V. Podol'ska, *Visnyk NAN Ukrainy*, No. 3: 14 (2011) (in Ukrainian).
8. V. Eh. Shpak, V. I. Podol'skaya, and Z. R. Ul'berg, *Kolloidnyi Zhurn.*, **57**, No. 1: 108 (1995) (in Russian).
9. Z. Ul'berg, T. Gruzina, and O. Karpov, *Visnyk NAN Ukrainy*, No. 8: 28 (2008) (in Ukrainian).
10. S. A. Wissing, O. Kayser, and R. H. Muller, *Advance Drug Delivery Rev.*, **56**: 1257 (2004).
11. L. S. Reznichenko, S. I. Mohnaty, T. G. Gruzina, A. M. Vorob'eva, and Z. R. Ul'berg, *Visnyk Problem Biologii i Medytsyny*, **1**, No. 3: 106 (2012) (in Russian).
12. O. V. Malanchuk, Z. R. Ul'berg, A. V. Rybachuk, L. S. Reznichenko, and T. G. Gruzina, *Dopovidi NAMN Ukrainy*, **18**, No. 3: 384 (2012) (in Russian).
13. Z. R. Ul'berg, A. S. Dukhin, and V. I. Karamushka, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1134**: 89 (1992).
14. I. S. Chekman, Z. R. Ul'berg, V. O. Malanchuk et al., *Nanonauka, Nanobiologiya, Nanofarmatsiya* (Kiev: Poligraf Plyus: 2012), p. 190 (in Russian).
15. Z. R. Ul'berg, L. G. Marochko, T. A. Polishhuk, and N. V. Pertsov, *Kolloidnyi Zhurn.*, **50**: 1026 (1988) (in Russian).
16. F. D. Ovcharenko, Z. R. Ul'berg, and N. V. Pertsov, *Zhurnal Vsesoyuznogo Khimicheskogo Obshchestva im. D. I. Mendeleeva*, **34**, No. 2: 159 (1989) (in Russian).
17. Z. R. Ul'berg, V. I. Karamushka, and T. G. Gruzina, *Biotekhnologiya*, **1**: 109 (1986) (in Russian).
18. Z. R. Ul'berg and L. G. Marochko, *Colloids and Surfaces. A. Physicochemical and Engineering Aspects*, **159**: 513 (1999).

19. P. Mitchell, *Biol. Rev. Cambridge Phil. Soc.*, **41**: 445 (1966).
20. P. Mitchell, *Nature*, **191**: 144 (1961).
21. B. V. Derjaguin and M. V. Golovanov, *Colloids Surf.*, **10**: 77 (1984).
22. M. V. Golovanov and B. V. Derjaguin, *Colloids J.*, **41**, No. 4: 649 (1979).
23. H. Frolich, *Quantum Chem.*, **2**: 641(1968).
24. H. Frolich, *Nature*, **228**: 1093 (1970).
25. Z. R. Ul'berg, V. I. Karamushka, A. K. Vidybida, A. K. Serikov, A. S. Dukhin, T. G. Gruzina et al., *Biochim. Biophys. Acta*, **1134**: 89 (1992).
26. A. S. Dukhin, V. I. Karamushka, Z. R. Ul'berg, and I. G. Abidor, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **26**, No. 2: 131(1991).
27. A. S. Dukhin, *Colloids Surf. A*, **79**: 29 (1993).
28. V. I. Karamushka, Z. R. Ul'berg, T. G. Gruzina, and A. S. Dukhin, *Acta Biotechnol.*, **11**, No. 3: 197 (1991).
29. V. I. Karamushka, Z. R. Ul'berg, and T. G. Gruzina, *Ukr. Biokhimicheskij Zhurn.*, **62**, No. 1: 76 (1990) (in Russian).
30. Z. R. Ul'berg, V. I. Podol'skaya, V. I. Karamushka, and N. V. Pertsov, *Kolloidnyi Zhurn.*, **48**, No. 5: 1038 (1985) (in Russian).
31. B. V. Derjaguin, S. S. Dukhin, A. A. Korotkova, *Kolloidnyi Zhurn.*, **23**, No. 1: (1961) (in Russian).
32. S. S. Dukhin, B. V. Derjaguin, Z. R. Ul'berg, and T. V. Kuznetsova, *Kolloidnyi Zhurn.*, **40**, No. 3: 464 (1980) (in Russian).
33. B. V. Derjaguin, S. S. Dukhin, Z. R. Ul'berg, and G. L. Dvornichenko, *Yavlenie Diffuzioforeza* (Diplom na Otkrytie No. 376 Goskomizobreteniy SSSR; Gos. registratsiya 21.12.1989) (in Russian).
34. F. D. Ovcharenko, V. R. Estrela-Llopis, A. I. Gavriljuk, and A. S. Dukhin, *Fiziko-Khimicheskaya Mekhanika i Liofil'nost' Dispersnykh Sistem* (Kiev: Naukova Dumka: 1985), Iss. 17, p. 3 (in Russian).
35. F. D. Ovcharenko, N. V. Pertsov, Z. R. Ul'berg, V. R. Estrela-Llopis et al., *Fiziko-Khimicheskaya Mekhanika i Liofil'nost' Dispersnykh Sistem* (Kiev: Naukova Dumka: 1985), Iss. 17, p. 96 (in Russian).
36. V. R. Estrela-Llopis, F. D. Ovcharenko, and I. N. Yurkova, *Fiziko-Khimicheskaya Mekhanika i Liofil'nost' Dispersnykh Sistem* (Kiev: Naukova Dumka: 1991), Iss. 22, p. 1 (in Russian).
37. L. L. Grinus, P. Yu. Daugelavichius, and G. A. Alkimavichius, *Biochimica*, **45**: No. 9: 1609 (1980).
38. V. P. Skulachev, *Transformatsiya Ehnergii v Biologicheskikh Membranakh* (Moscow: Nauka: 1972), p. 244 (in Russian).
39. E. A. Liberman and V. P. Skulachev, *Biochimica et Biophysica Acta*, **216**: 30 (1970).
40. L. E. Bakeeva, L. L. Grinus, A. A. Jasaitis, E. A. Liberman et al., *Biochimica et Biophysica Acta*, **216**: 13 (1970).
41. J. Tsoneva and Tj. Tonov, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **12**: 232 (1984).
42. T. F. Grifanova, *Sravnenie Ehlektropoverkhnostnykh Svoystv i Agregativnoy Ustoychivosti Neorganicheskikh i Biologicheskikh Ob'ektov* (Diss. ... Cand. Chem. Sci.) (Leningrad: LGU: 1985) (in Russian).
43. V. I. Karamushka, A. S. Dukhin, T. G. Gruzina, S. G. Sklyarov, and Z. R. Ul'berg, *Fiziko-Khimicheskaya Mekhanika i Liofil'nost' Dispersnykh Sistem* (Kiev: Naukova Dumka: 1989), Iss. 20, p. 60 (in Russian).
44. Z. R. Ul'berg, V. I. Karamushka, and F. D. Ovcharenko, *Doklady AN SSSR*,

- 303, No. 3: 738 (1984) (in Russian).
45. Z. R. Ul'berg, V. I. Karamushka, T. G. Gruzina, A. S. Dukhin et al., *Kolloidnyi Zhurn.*, **52**, No. 1: 172 (1990) (in Russian).
 46. V. F. Chekhun, G. I. Kulik, O. V. Yurchenko et al., *Cancer Lett.*, **231**, No. 1: 87 (2006).
 47. G. V. Danilovich, T. G. Gruzina, Z. R. Ulberg, and S. O. Kosterin, *Ukr. Biokhim. Zhurnal*, **76**, No. 5: 45 (2004) (in Ukrainian).
 48. G. V. Danylovysh, T. G. Gruzina, Z. R. Ul'berg, and S. O. Kosterin, *Ukr. Biokhim. Zhurnal*, **79**, No. 4: 46 (2007) (in Ukrainian).
 49. H. A. Pohl, W. T. Philips, and J. K. Pollock, *Energy Transfer Dynamics* (Eds. T. W. Barrett and H. A. Pohl) (Springer-Verlag: 1987), p. 273.
 50. H. A. Pohl, *Dielectrophoresis the Behavior of Neutral in Nonuniform Electric Fields* (Cambridge: Cambridge University Press: 1978).
 51. H. A. Pohl, T. Braden, S. Robinson, J. Piclardi, and D. G. Pohl, *J. Biol. Phys.*, **9**: 133 (1981).
 52. H. Rivera, J. K. Pollock, and H. A. Pohl, *Cells Biophys.*, **7**: 43 (1985).
 53. J. C. Maxwell, *Electricity and Magnetism* (Oxford: Clarendon Press: 1892), vol. 1.
 54. K. W. Wagner, *Arch Elektrotech.*, **2**: 371 (1914).
 55. S. S. Dukhin and V. N. Shilov, *Dielectric Phenomena and Double Layer in Dispersed Systems and Polyelectrolytes* (New York: John Wiley and Sons: 1974).
 56. V. A. Murtsovkin, *Experiment. Colloid J.*, **3**: 354 (1987).
 57. B. V. Derjaguin and S. S. Dukhin, *Colloid J.*, **46**, No. 4: 645 (1984).
 58. B. V. Derjaguin, S. S. Dukhin, and A. V. Listovnichiy, *Colloid J.*, **47**, No. 3: 480 (1985).
 59. J. L. Anderson and D. S. Prieve, *Langmuir*, **7**: 403 (1991).
 60. J. Lyklema, *Fundamental of Interface and Colloid Science* (London-New York: Academic Press: 1995–2000), vols. 1–3.
 61. B. Alberts, J. Lewis, A. Johnson, M. Raff, K. Roberts, and P. Walters, *Molecular Biology of Cells (4th edition)* (New York: Garland Science: 2002).
 62. P. Mitchell, *J. Theor. Biol.*, **62**: 327 (1976).
 63. V. N. Shilov and Z. R. Ul'berg, *Kolloidnyi Zhurn.*, **76**, No. 5: (2014) (in Russian).
 64. R. Lévy, U. Shaheen, Y. Cesbron, and V. Sée, *Nano Reviews*, **1**: 10.3402/nano.v1i0.4889 (2010).
 65. A. I. Omel'chenko, *Visnik Ugors'kogo Derzhavnogo Universitetu*, **2**, No. 21: 40 (2011).
 66. E. E. Connor, J. Mwamuka, A. Gole, C. J. Murphy, and M. D. Wyatt, *Small*, **1**: 325 (2005).
 67. J. R. Morones, J. Elechiguerra, A. Camacho, K. Holt, J. B. Kouri, and J. T. Ramirez, *Nanotechnology*, **16**, No. 10: 2346 (2005).
 68. G. J. Doherty and H. T. McMahon, *Ann. Rev. Biochem.*, **78**: 857 (2009).
 69. S. D. Conner and S. L. Schmid, *Nature*, **422**: 37 (2003).
 70. Y. Zhou, R. E. Cui, and C. X. Deng, *Ultrasound Med. Biol.*, **35**: 1756 (2009).
 71. K. Otani, K. Yamahara, S. Ohnishi, H. Kitamura, and N. Nagaya, *Control Release*, **9**: 146 (2009).
 72. E. Tekle, R. Astimian, and P. B. Chock, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**: 4230 (1991).

73. B. V. Derjaguin, *Zhurn. Fiz. Khimii*, **6**, No. 10: 1306 (1935) (in Russian).
74. H. Ti Tien, *Bilayer Lipid Membranes (BLM): Theory and Practice (1st edition)* (New York: Marcel Dekker, Ink.: 1974), ch. 6–7.
75. I. G. Abidor, V. V. Arakeljan, and V. F. Pastushenko, *Doklady AN SSSR*, **240**, No. 3: 1306 (1978) (in Russian).