



**Конкурс работ молодых ученых «Просто о сложном»
Научно-популярная статья призера III степени Наташиной Ульяны
Александровны (аспирант 2 года обучения, МГУ имени
М.В.Ломоносова, г. Москва)**

**Антибактериальный эффект кремниевых наночастиц,
активированных терапевтическим ультразвуком¹**

Введение

Кремний является вторым из наиболее распространенных элементов на Земле после кислорода. Всем известно, что кремний является базовым материалом современной электроники, и его физико-химические свойства достаточно полно изучены. Однако, наноформа данного материала в виде наночастиц пористого кремния обладает также уникальными свойствами биосовместимости и биodeградируемости. Общее содержание кремния в теле здорового взрослого человека весом 70 кг в норме составляет 0.5-1 г, что делает кремний одним из наиболее распространенных микроэлементом в организме человека.

В наших экспериментах *in-vivo* мы продемонстрировали, что наночастицы пористого кремния, размером около 100 нм, при их внутривенном введении не оказывают токсических свойств на организм вплоть до концентраций 30 мкг наночастиц на 1 кг массы тела животного. В экспериментах *in-vitro* (с выращенными в пробирке клетками) наночастицы пористого кремния не вызвали гибели клеток вплоть до концентраций 200 мг/мл.

Биodeградация наночастиц заключается в их полном растворении при попадании в биологическую среду. Скорость растворения частиц зависит от pH среды, и может варьироваться от нескольких часов (в щелочной pH) до нескольких недель (в кислой pH). Нами было показано *in-vitro*, что при нейтральных pH частицы полностью растворяются за 13-14 дней. При этом продуктом биodeградации наночастиц является кремниевая кислота (Si(OH)₄). Следует особо отметить, что кремниевая кислота не только не токсична, но и является необходимой для нормального развития организма (в частности, для роста костей, соединительных тканей).

¹ Научно-популярная статья основана на материалах публикаций:

1. Liubov A. Osminkina, Vladimir Sivakov, Grigory A. Mysov, Florian Talkenberg, **Ulyana A. Natashina**, V. V. Solovyev, Andrey A. Kudryavtsev, and Victor Yu. Timoshenko, "Nanoparticle suspensions prepared from porous silicon nanowires for bioimaging and sonodynamic therapy", *Nano Research Letters* 9, 463, 2014.
2. Tolstik E., Osminkina L.A., Matthäus C., Burkhardt M., Tsurikov K.E., **Natashina U.A.**, S. Shestaeva, M. Burkhardt, A.N. Vasiliev, V.Yu. Timoshenko, R. Heintzmann, J. Popp, and V. Sivakov "Studies of Silicon Nanoparticles Uptake and Biodegradation in Cancer Cells by Raman Spectroscopy", *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 12(7), 2016.
3. Svetlana N. Shevchenko, Markus Burkhardt, Eugene Sheval, **Ulyana A Natashina**, Christina Große, Alexander Lvovich Nikolaev, Alexander V. Gopin, Ute Neugebauer, Andrew A. Kudryavtsev, Vladimir Sivakov, Liubov A Osminkina "Antimicrobial effect of biocompatible silicon nanoparticles activated by therapeutic ultrasound" *Langmuir* 33(10), 2017.
4. N K Kozlov, **U A Natashina**, K P Tamarov, M B Gongalsky, V V Solovyev, A A Kudryavtsev, V Sivakov and L A Osminkina «Recycling of silicon: from industrial waste to biocompatible nanoparticles for nanomedicine» *Materials Research Express*, Volume 4, Number 9 Published 28 September 2017.

Основные аспекты исследования

В своём исследовании мы сообщаем о методе подавления жизнеспособности бактерий *Escherichia coli* (*E.coli*) с помощью терапевтического ультразвукового облучения (УЗИ) с использованием биосовместимых наночастиц кремния в качестве сенсibilizаторов кавитации. Для начала, разберёмся в проблеме и способе её решения. Кишечная палочка – вид граммотрицательных палочковидных бактерий, широко распространённых в нижней части кишечника теплокровных животных. Некоторые штаммы могут вызывать тяжёлые пищевые отравления у людей и животных, вплоть до летальных исходов. Кавитация – процесс образования и последующего схлопывания пузырьков в потоке жидкости, сопровождающийся шумом и гидравлическими ударами, образование в жидкости полостей. С помощью этого явления можно достичь гибели бактерий. Однако, не без помощи кремниевых наночастиц.

В работе мы использовали кремниевые наночастицы без (SiNP) и с полисахаридным (декстрановым) покрытием (DSiNP). Оба типа наночастиц были нетоксичны для клеток Hep 2 (эпителиальные клетки рака гортани) до концентрации 2 мг / мл. Обработка бактерий наночастицами и применение УЗИ мощностью 1 Вт / см² привели к снижению их жизнеспособности до 35 и 72% для SiNP и DSiNP, соответственно. Более высокое снижение жизнеспособности бактерий для DSiNP по сравнению с SiNP можно объяснить тем фактом, что биополимерная оболочка полисахарида обеспечивает более сильную адгезию (сцепление) наночастиц к поверхности бактерий. Исследования с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) показали, что бактериальная липидная оболочка была частично перфорирована (разрушена) после комбинированной обработки DSiNP и УЗИ, что можно объяснить лизисом (один из механизмов гибели) бактериальной мембраны из-за кавитации, сенсibilizированной SiNP. Кроме того, мы показали, что 100%-ное ингибирование роста колоний бактерий *E. coli* возможно путем сочетания обработок DSiNP и УЗИ с повышенной интенсивностью до 3 Вт / см². Наблюдаемые результаты показывают применение SiNP в качестве перспективных противомикробных препаратов.

Методика получения наночастиц

Исследуемые образцы представляли собой ансамбли кремниевых нанонитей (SiNWs), выращенные на подложках кристаллического кремния (c-Si). Метод металл-стимулированного химического травления проходил в две ступени. На первом этапе использовался раствор, представляющий собой смесь 0,02 М AgNO₃ и 5 М HF в соотношении 1:1, в который помещались образцы на 30-60 секунд. На этой стадии происходил процесс нанесения серебра на поверхность кремниевой пластины. На втором этапе в растворе смеси 5 М HF и 30% H₂O₂ в соотношении 10:1 происходил процесс химического травления кремниевой пластины в местах, покрытых серебром. После этого образцы промывались дистиллированной водой. Для того, чтобы избавиться от частиц серебра, образцы погружались в концентрированную азотную кислоту (HNO₃) на 15 минут. Схема травления представлена на рис. 1. В представленной работе образцы кремниевых нанонитей получались из кристаллического кремния (c-Si) p-типа с односторонней полировкой, ориентацией (100). Удельное сопротивление исходных подложек кремния составляло: 10 Ω*см и 0.001 Ω*см. Для удаления оксидного слоя с поверхности c-Si перед травлением, пластины погружались на 1 минуту в 49% раствор HF. Полученные образцы SiNWs были названы LD-SiNWs и HD-SiNWs, согласно сопротивлению кремниевых подложек: 10 Ω*см и 0.001 Ω*см, соответственно.

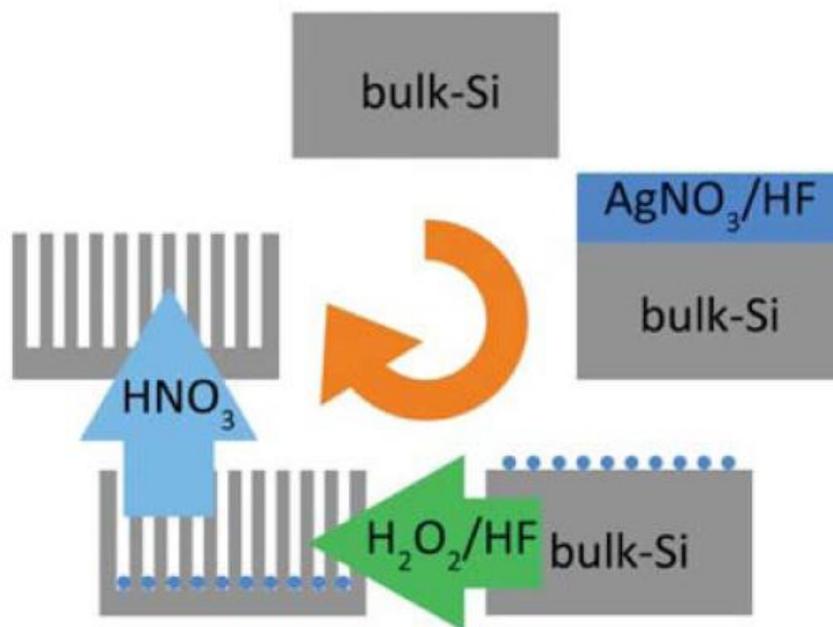


Рис. 1. Схема травления кремниевой пластины для получения SiNWs, используя двухступенчатый метод MACE

Получение кремниевых наночастиц путем измельчения SiNWs в ультразвуке

В данной работе кремниевые наночастицы (SiNPs) получались путем ультразвуковой дисперсации (механического измельчения) массивов SiNWs. Пластины с SiNWs в воде погружались в УЗ-ванну на 2 часа. (Elmasonic US bath 37 КГц). Фото процесса представлено на рис.2.

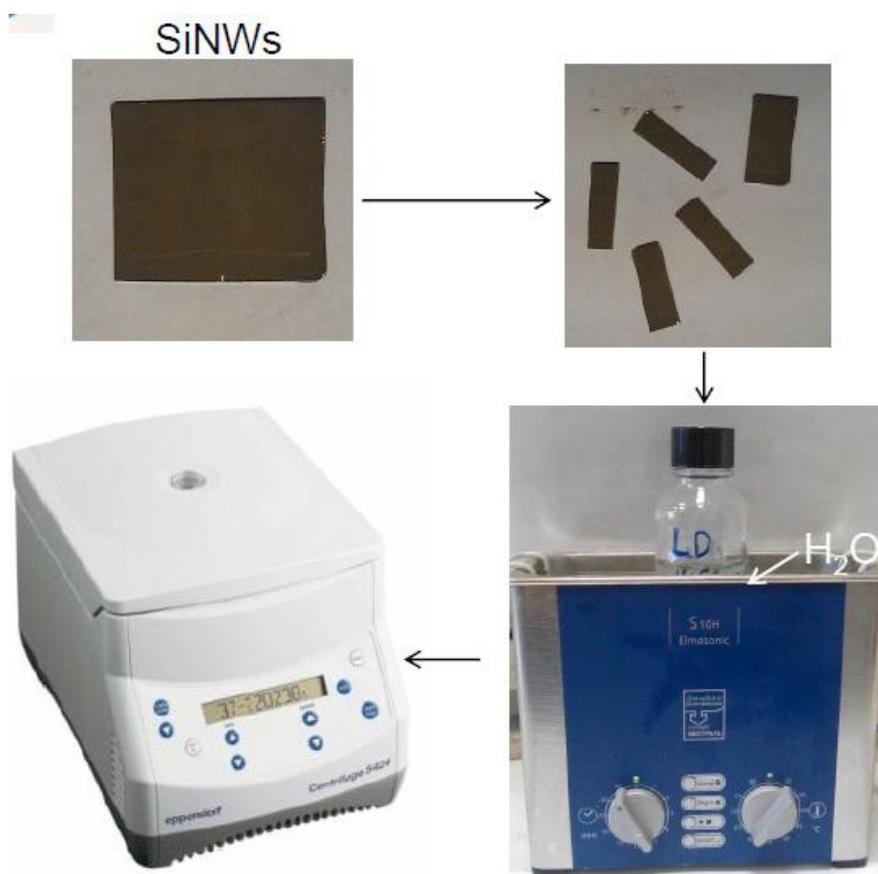


Рис. 2. Процесс УЗ измельчения SiNWs.

Затем, после ультразвукового воздействия, с помощью центрифугирования были получены суспензии SiNPs. Согласно принятым обозначениям для SiNWs, суспензии частиц были также названы HD-SiNPs и LD-SiNPs. (рис.3).

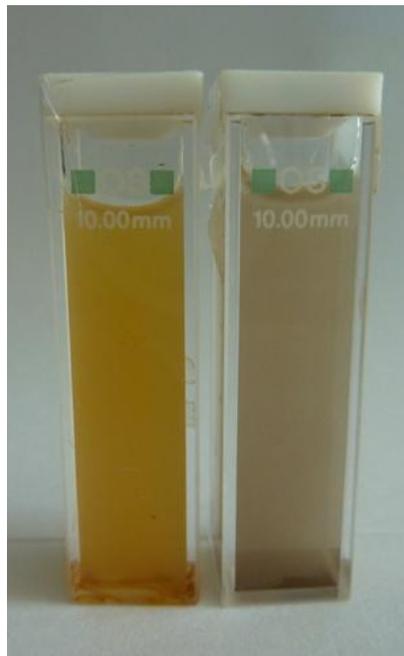


Рис. 3. Типичный вид суспензий HD-SiNPs (слева) и LD-SiNPs (справа).

Кремниевые наночастицы, полученные путем ультразвуковой диспергации массивов SiNWs также покрывались биосовместимым полимером декстраном. Для этого свежеприготовленные водные суспензии SiNPs были центрифугированы в течение 2 минут при 2000 об/мин, затем полученный супернатант (верхняя фракция раствора) был разбавлен водой до концентрации 1 мг/мл. Покрытие декстраном производилось путём смешивания водной суспензии SiNPs и раствора декстрана (0,9% NaCl) в соотношении 1:1. Затем суспензия подвергалась гомогенизированной ультразвуковой обработке при 30 кГц в течение 30 минут и хранилась в темноте в течение 24 часов перед экспериментом.

Основные результаты и актуальность открытия

В работе были изучены возможности SiNPs выступать в роли сенсibilizаторов ультразвукового излучения (УЗИ). Для этого были проведены модельные эксперименты по определению нагрева суспензий наночастиц и сдвига в них порогов кавитации по сравнению с чистой водой. На рис.4а представлен результат нагрева водных суспензий SiNPs (1 мг/мл) и воды в зависимости от длительности времени их облучения УЗИ (частота 1 МГц, W=10 Вт, площадь поперечного сечения пучка УЗ волны $S \approx 3 \text{ см}^2$). На рис.29б представлены зависимости амплитуды сигнала гидрофона от мощности УЗИ для суспензии HD-SiNPs (красный) и воды (синий). Частота УЗИ в данных экспериментах составляла 0.88 МГц.

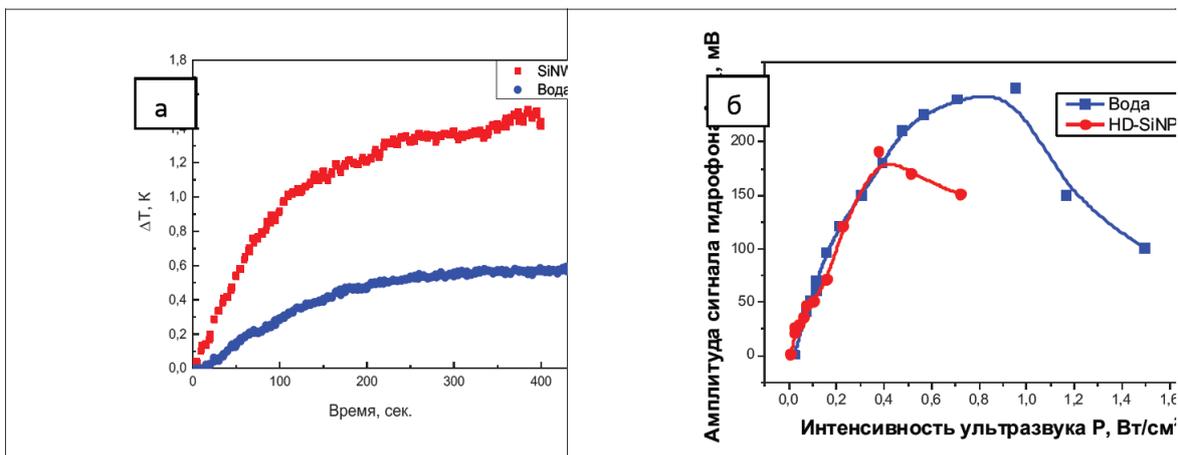


Рис. 4. (а) Зависимость нагрева суспензии HD-SiNPs (красный) и воды (синий) от времени облучения УЗИ на частоте 1 МГц и мощности 10 Вт. (б) Зависимость амплитуды сигнала гидрофона от мощности УЗИ для суспензии HD-SiNPs (красный) и воды (синий).

Видно, что суспензии HD-SiNPs под действием УЗИ нагреваются примерно на 1 К больше по сравнению с чистой водой за первые 150 секунд облучения. При этом в первые 150 сек нагрев линейно зависел от времени. Нелинейная зависимость нагрева от времени при больших временах облучения возникла, по-видимому, из-за теплообмена с окружающей средой. Вместе с тем, в суспензиях наночастиц наблюдалось понижение порогов акустической кавитации по сравнению с чистой водой. Действительно, согласно рис. 29б, кавитации в суспензиях SiNPs 1мг/мл наступают уже при интенсивности УЗИ 0.4 Вт/см², в то время, как в воде – около 1 Вт/см². Описанные эффекты можно связать с поглощением энергии УЗ волны на наночастицах в их водной суспензии, и являются доказательством соносенсибилизации наночастицами HD-SiNPs УЗИ терапевтических частот и интенсивностей.

Изучение цитотоксических свойств кремниевых наночастиц

В *in-vitro* экспериментах по цитотоксичности, Нер-2 клетки рака гортани человека подверглись 24 часовому инкубированию с SiNPs или с культуральной средой (контроль). Подсчет клеток был сделан с помощью стандартного метода с использованием гемоцитометра. Живые и мертвые клетки отделяли путем предварительного окрашивания образцов. Проведенные *in-vitro* эксперименты показали, что такие ФЛ SiNPs характеризуются низкими цитотоксическими свойствами (до 200 мкг/мл). Результаты представлены на рис.5.

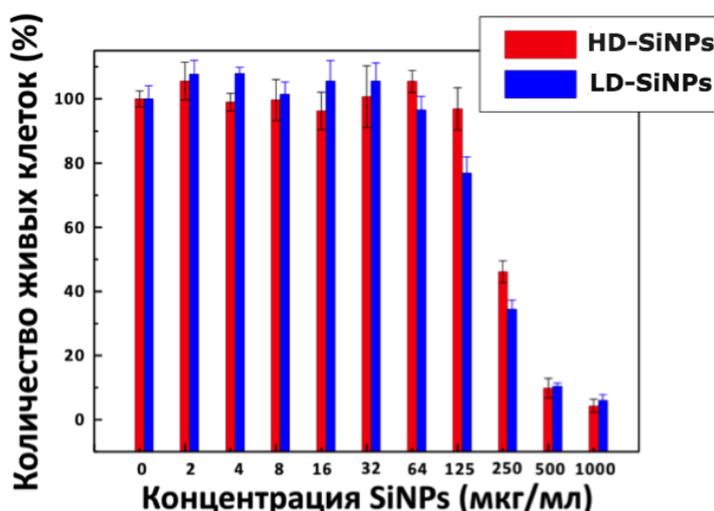


Рис. 5. Диаграмма зависимости количества живых клеток от концентрации SiNPs.

Изучение влияния совместного действия УЗ и кремниевых наночастиц на клетки и бактерии *in-vitro*

В проведенных *in-vitro* экспериментах с раковыми клетками Hep-2, HD-SiNPs (0,1 мг/мл) в культуральной среде добавляли к клеткам и оставляли на 14 ч до начала эксперимента. Суспензию клеток затем подвергали УЗИ (0,88 МГц, 0.5 Вт/см²). На рис.6 представлена зависимость количества живых клеток от продолжительности УЗИ. Клетки без HD-SiNPs и без каких-либо дополнительных влияния на них были приняты в качестве контрольной группы. Выяснилось, что сама по себе обработка УЗИ терапевтических мощностей и интенсивностей, по существу не влияет на жизнеспособность клеток в течение временного интервала от 0 до 10 мин. В то же время, комбинированное действие УЗИ и HD-SiNPs привело к 50% снижению числа живых клеток за 10 минут обработки.

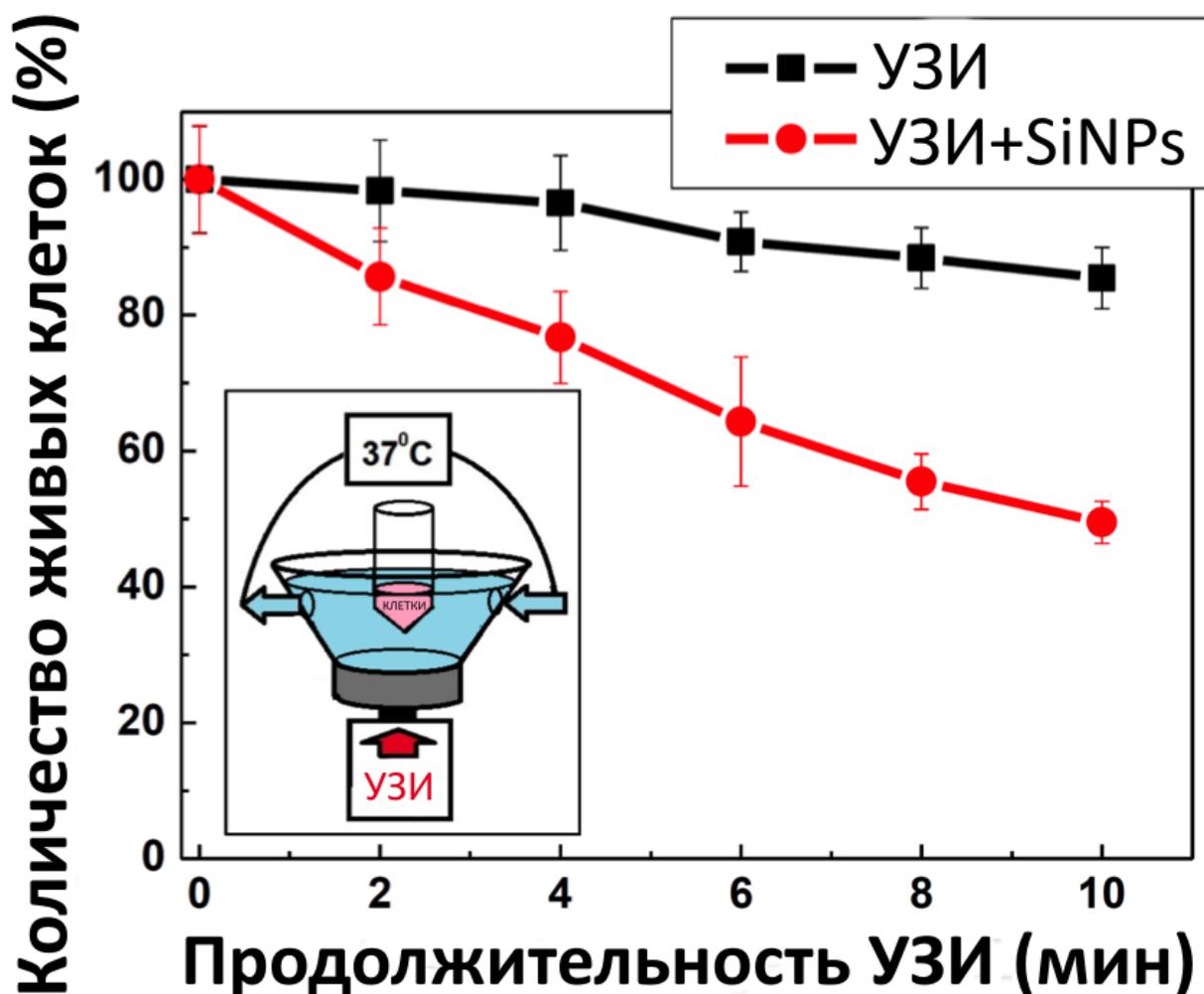


Рис. 6. Зависимость числа клеток Hep-2, по отношению к контролю, от времени обработки УЗИ (черная кривая) и комбинированным воздействием УЗИ и HD-SiNPs (красная кривая). На вставке к рисунку представлена схема проведения *in-vitro* экспериментов.

В ходе работы было также изучено взаимодействие кремниевых наночастиц и бактерий, в том числе при сочетанном действии кремниевых наночастиц и ультразвука на бактерии. На рис.7 представлены микрофотографии ПЭМ бактерий E.Coli (штамм JM109).

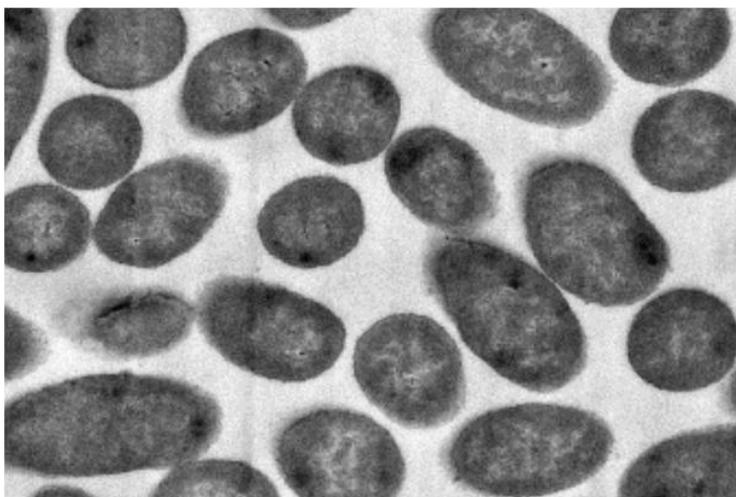


Рис. 7. Микрофотографии ПЭМ бактерий *E. Coli* (штамм JM109).

Из рис.7 видно, что бактерии *E. Coli* имеют преимущественно форму вытянутых эллипсоидов. На микрофотографиях также хорошо видна оболочка бактерий, которая, как известно у *E. coli*, грам-отрицательной бактерии, состоит из наружной липополисахаридной мембраны, белково-гликановой клеточной стенки и внутренней плазматической мембраны (фосфолипидный бислой, содержащий погруженные в него белки).

Согласно полученным результатам, как HD-SiNPs так и DSiNPs не демонстрировали цитотоксических свойств вплоть до концентраций 5 мг/мл по отношению к изучаемым бактериям (рис. 8). При этом не наблюдалось также влияния на рост бактерий их обработка бактериях УЗИ с интенсивностью 1 Вт/см². Увеличение интенсивности УЗИ до 3 Вт/см² приводило к гибели 30% бактерий по сравнению с контролем (рис. 33б). Обработка УЗИ в обоих случаях проводилась в течение 10 мин.

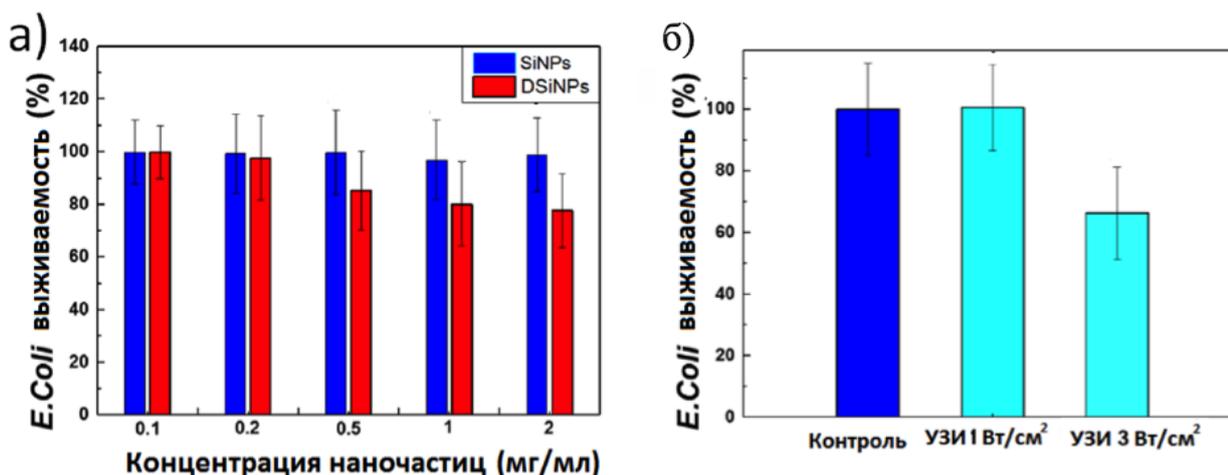


Рис. 8. а) Токсические свойства HD-SiNPs и DSiNPs по отношению к бактериям *E. Coli*; б) Влияние УЗИ с различными интенсивностями на выживаемость *E. Coli*.

Совместное воздействие УЗИ 1 Вт/см² и SiNPs (10 мин) приводило к гибели 35% бактерий по сравнению с контролем. При этом при совместном воздействии на бактерии УЗИ (10 мин) с той же интенсивности и DSiNPs, достигалась их 75% гибель. Это указывает на лучшую сорбцию на поверхность бактерий наночастиц, покрытых декстраном. При этом 100% гибель бактерий наблюдалась при совместном воздействии на них SiNPs и DSiNPs и ультразвука 3 Вт/см² (10 мин) (см рис. 9а). Представленные выше результаты также подтверждаются фотографиями чашек Петри на рис. 9б.

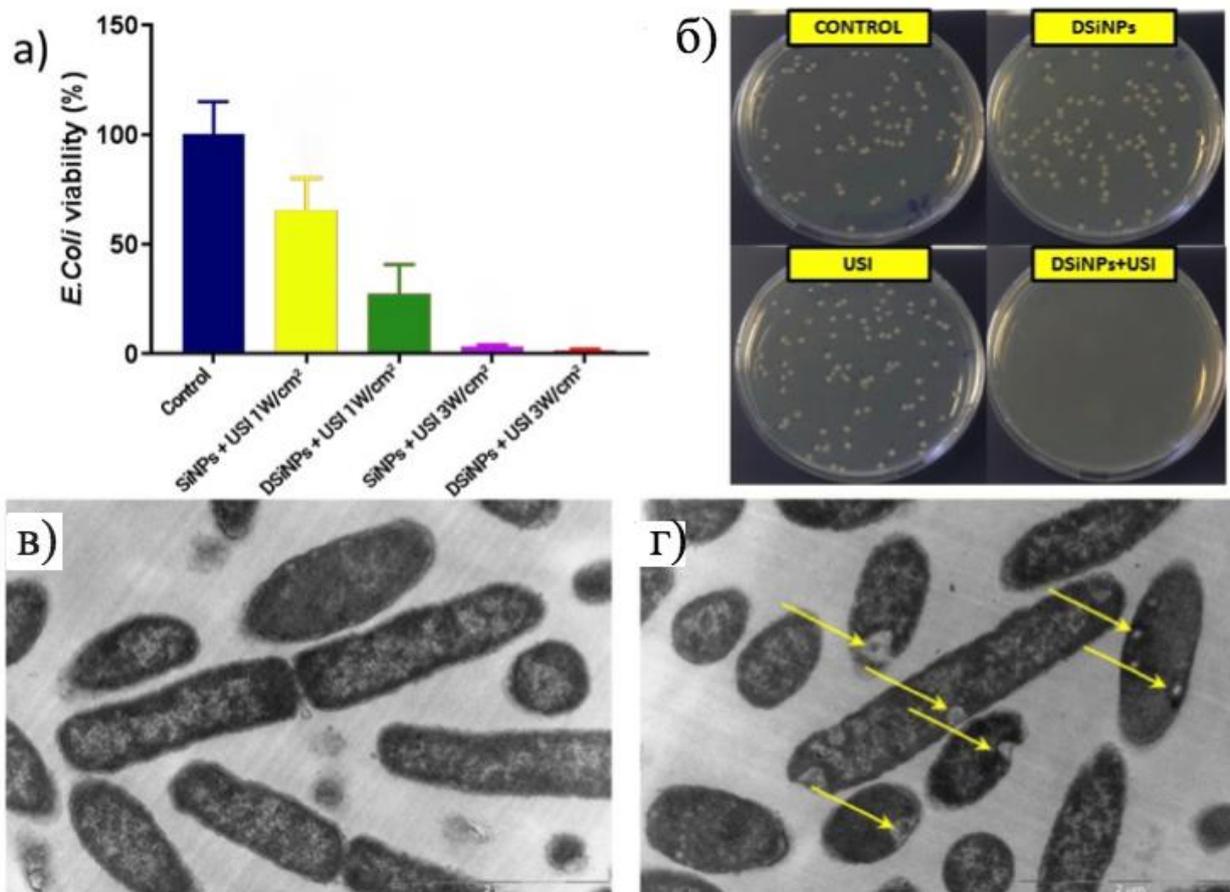


Рис. 9. а) Зависимость числа живых бактерий от интенсивности УЗИ и типа наночастиц; б) Фотография чашек Петри с бактериями *E.coli* контрольной группы, после воздействия *SiNPs*, после воздействия УЗИ, и после сочетанного воздействия *HD-SiNPs*, *DSiNPs* и УЗИ; в) микрофотографии ПЭМ бактерий *E.coli* до и после взаимодействия с наночастицами и УЗИ, соответственно.

Типичные изображения ПЭМ бактерий *E.coli* после их смешивания с *DSiNP* 1 мг/мл и после комбинированной 10 минутной обработки 1 мг/мл *DSiNPs* и 1 Вт/см² УЗИ представлены на рис.9 в), г), соответственно.

Таким образом, никаких изменений в структуре клеточной стенки бактерий *E.coli* не было отмечено после взаимодействия бактерий с *DSiNP* без УЗИ (см. Рис. 9в). Однако, очевидные изменения в структуре стенок бактерий *E.coli* наблюдались после их комбинированной 10-минутной обработки 1 мг/мл *DSiNPs* и 1 Вт/см² УЗИ, как это хорошо видно на рис.9 г). Так, наблюдалась перфорация клеточных стенок (указано желтыми стрелками на рисунке 9г), что может быть объяснено лизисом бактериальной мембраны из-за кавитации, сенсibilизированной наночастицами.

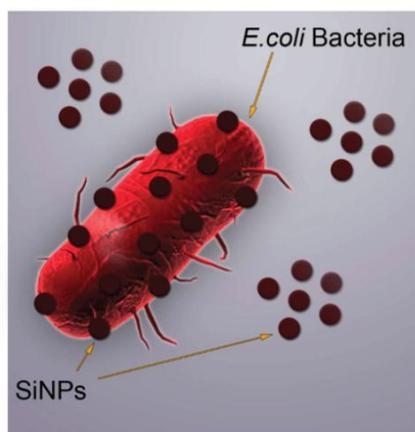
Мы впервые продемонстрировали новый способ снижения жизнеспособности бактерий с помощью кремниевых наночастиц и УЗИ.

Дополнительные иллюстрации

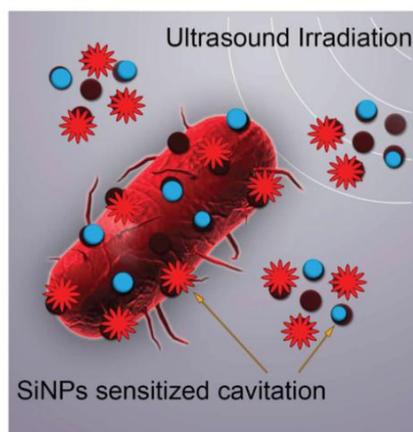


Antibacterial

Step 1



Step 2



Step 3

