

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра биохимии и биофизики

**СИНТЕЗ И ПРИМЕНЕНИЕ В БИОЛОГИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ
ФУНКЦИОНАЛИЗИРОВАННЫХ СИЛИКАТНЫХ НАНОЧАСТИЦ**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студента 4 курса 421 группы

Направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология

Биологического факультета

Савельева Григория Константиновича


Научный руководитель,
доцент,
канд. биол. наук:


Е.С. Тучина
30.05.2023
дата, подпись

Научный консультант,
в.н.с. лаборатории
нанобиотехнологии,
ИБФРМ РАН,
док. физ.-мат. наук:


Б.Н. Хлебцов
дата, подпись
30.05.2023

Зав. кафедрой,
профессор,
д-р биол. наук:


С.А. Коннова
дата, подпись
30.05.2023

Саратов, 2023

Введение. Силикатные наночастицы представляют значительный интерес для множества приложений, включая фотонику [1], биомедицину [2], биосенсинг [3], катализ [4] и другие благодаря простоте синтеза, возможности получать частицы в широком диапазоне размеров, биоинертности и высокой химической стабильности.

В 1968 году Штобер и соавторы опубликовали протокол получения силикатных наночастиц путем гидролитической конденсации силикатных прекурсоров в среде алкоголя с использованием аммиака в качестве катализатора [5]. Размер частиц в оригинальной работе составлял от десятков до сотен нанометров и контролировался путем изменения концентрации аммиака, вида спирта, а также вида силанового прекурсора. Хотя метод Штобера прост в исполнении, имеются некоторые ограничения. Во-первых, с помощью него невозможно получить коллоиды с диаметром частиц менее 50 нм (некоторые авторы указывают нижний порог 70 нм) [6]. Во-вторых, сравнительно монодисперсные коллоиды (<5%) получаются только для размеров частиц 120-500 нм [7, 8], в то время как для меньших и больших частиц полидисперсность достигает 20% [7]. Это обусловлено, тем, что при синтезе происходит непрерывное образование и рост зародышевых частиц, а добавление в реакционную смесь слишком малого или слишком большого количества реагентов нарушает баланс между скоростью гидролиза и конденсации.

Одним из возможных решений проблемы полидисперсности может стать использование многосдадного протокола, при котором частицы, полученные на определенной стадии, используются как центры конденсации («зародыши») для роста более крупных частиц. Основными задачами на пути реализации этого подхода являются получение малых (менее 50 нм) монодисперсных зародышевых частиц для первой стадии перероста и дальнейший контроль отсутствия образования вторичных зародышей.

Целью работы является разработка методики синтеза силикатных наночастиц с размерами меньше 50 нм для дальнейшей их функционализации и применения в биологической практике.

Для достижения этой цели были сформулированы следующие задачи:

1. Адаптировать методику синтеза силикатных частиц и проверить ее воспроизводимость и масштабируемость.
2. Провести синтез флуоресцентных силикатных наночастиц и оценить возможность их применения при визуализации биологических объектов.
3. Провести синтез силикатных наночастиц, конъюгированных с красителем индоцианином зеленым.
4. Изучить антибактериальный эффект функционализированных силикатных наночастиц при воздействии лазерного излучения (808 нм).

Бакалаврская работа включает содержание, список сокращений, введение, 3 главы (обзор литературы, материалы и методы, результаты исследований и их обсуждение), заключение, выводы и список использованных источников, включающий 86 источников. Работа изложена на 55 страницах машинописного текста. Работа проиллюстрирована 11 рисунками и 1 таблицами.

Объект исследования. Стандартный непатогенный штамм *Staphylococcus aureus* 209 P был получен из коллекции ГИСК им. Л. А. Тарасевич (г. Москва).

Синтез и характеристика силикатных наночастиц. Были синтезированы силикатные наночастицы с диаметром 29 нм и 48 нм с использованием полиакриловой кислоты в разных концентрациях (5 мг, 2,5 мг).

Метод перероста для получения силикатных наночастиц с размером 80 нм. Синтез заключался в использовании силикатных наночастиц с диаметром 48 нм в качестве прекурсора. Полученные частицы центрифугировали при 10000 g и ресуспендировали в этаноле с помощью ультразвука. Процедура центрифугирования/перерастворения повторялась 6 раз.

Получение силикатных наночастиц функционализированных флуоресцентным красителем. Синтез заключался в использовании флуоресцин изотиоцианат (ФИТИЦ) в качестве флуорофора, который был предварительно силанизирован с помощью 3-аминопропилтриметсилана. В дальнейшем были

синтезированы флюоресцентные наночастицы с использованием 300 нм «зародышей».

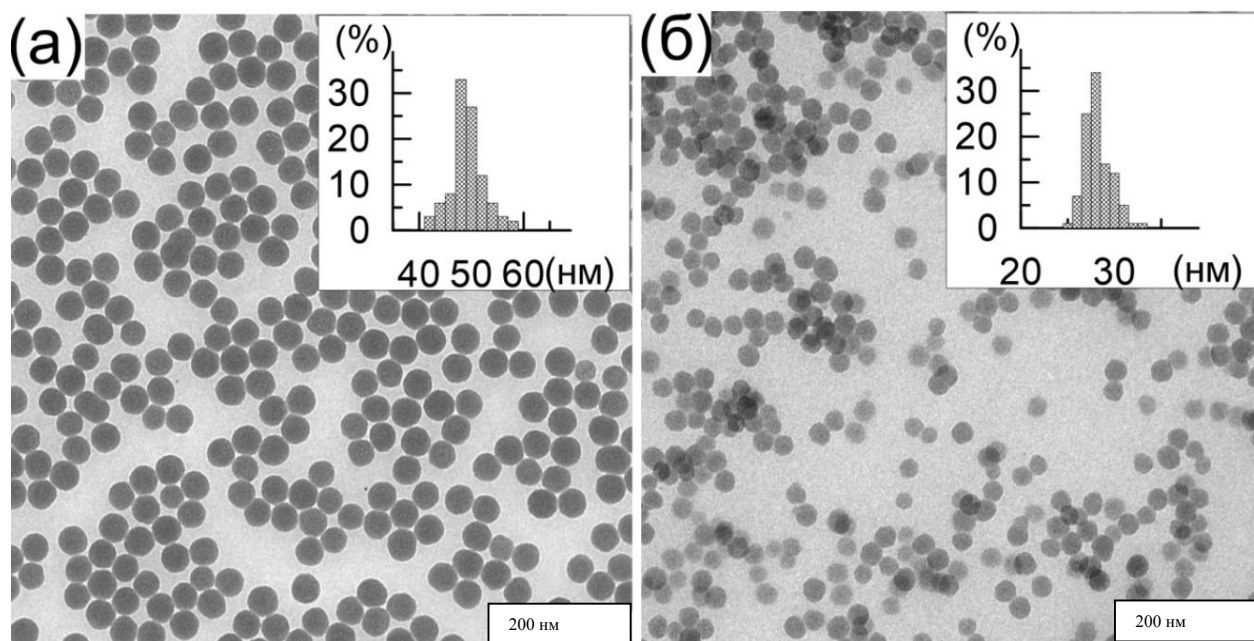
Получение силикатных наночастиц функционализированных индоцианином. Синтез заключается в использовании 100 нм силикатных наночастиц, которые конъюгируются с фотосенсибилизатором индоциановым зеленым.

Характеризация образцов. Измерение гидродинамического размера наночастиц проводили с использованием установки Zetasizer ZS (Malvern). Силикатные наночастицы исследовали с помощью электронного микроскопа «Libra 120» (Карл Цейсс, Германия) с ускоряющим напряжением 120 кВ в ЦКП «Симбиоз» при ИБФРМ РАН. Спектры оптической плотности образцов были получены с помощью спектрофотометра Specord S300 (Analytik Jena, Германия) в диапазоне длин волн 350-800 нм. Концентрация наночастиц определялась гравиметрически. Спектры флуоресценции образцов наночастиц с инкорпорированными флуорофорами измеряли с использованием спектрофлуориметра Cary Eclipse (США) при возбуждении длиной волны 488 нм.

Исследование противомикробной активности силикатных наночастиц функционализированных индоцианином. В качестве источника излучения использовали лазер с максимумом спектра испускания $\lambda=808$ нм и плотностью мощности 50 и 100 мВт/см². Микроорганизм *S. aureus* выращивался при температуре 37°C на ГРМ-агаре. В ходе эксперимента наночастицы конъюгированные с индоцианином зеленым облучались ИК лазером. Для оценки выживаемости строили калибровочный график, основываясь на оптической плотности бактериальных суспензий с известной концентрацией микробных клеток в инокуляте (от 10¹ до 10⁸ м.к./мл), через 18 ч культивирования в 0,5% пептоне. В качестве контроля принимали оптическую плотность суспензии, не подвергавшейся облучению и не обработанной ИК излучением. Все эксперименты проводились в десятикратной повторности. Обработка полученных данных проводилась в программе Statistica 10.

Основное содержание работы.

Синтез и характеристика кремневых частиц. Для получения силикатных наночастиц с размерами в диапазоне 30-50 нм был использован модифицированный метод Штобера, который включает в себя добавление полиакриловой кислоты (ПАК) в реакционную смесь (рисунок 1). В присутствии аммиака ПАК образует нерастворимый в этаноле комплекс ПАК-NH₃ [84].



а – концентрация ПАК 2,5 мг; б – концентрация ПАК 5 мг;

Рисунок 1 – Изображения силикатных наночастиц, полученных с помощью разных концентраций ПАК (ПЭМ, масштабная метка 200 нм)

Необходимо обозначить весомую роль ПАК в формировании относительно монодисперстного коллоида с диаметром частиц менее 70 нм. К примеру, если мы соблюдаем все условия синтеза, но исключаем добавление ПАК, то происходит формирование полидисперстного коллоида со средним диаметром частиц 170 нм (рисунок 2). Также, было обнаружена важность использования ПАК с низким молекулярным весом (1,8 кДа). При использовании ПАК с молекулярными весами 35 кДа и 100 кДа наблюдается помутнение ростового раствора и выпадение осадка еще до начала добавления тетраэтилортосиликата.

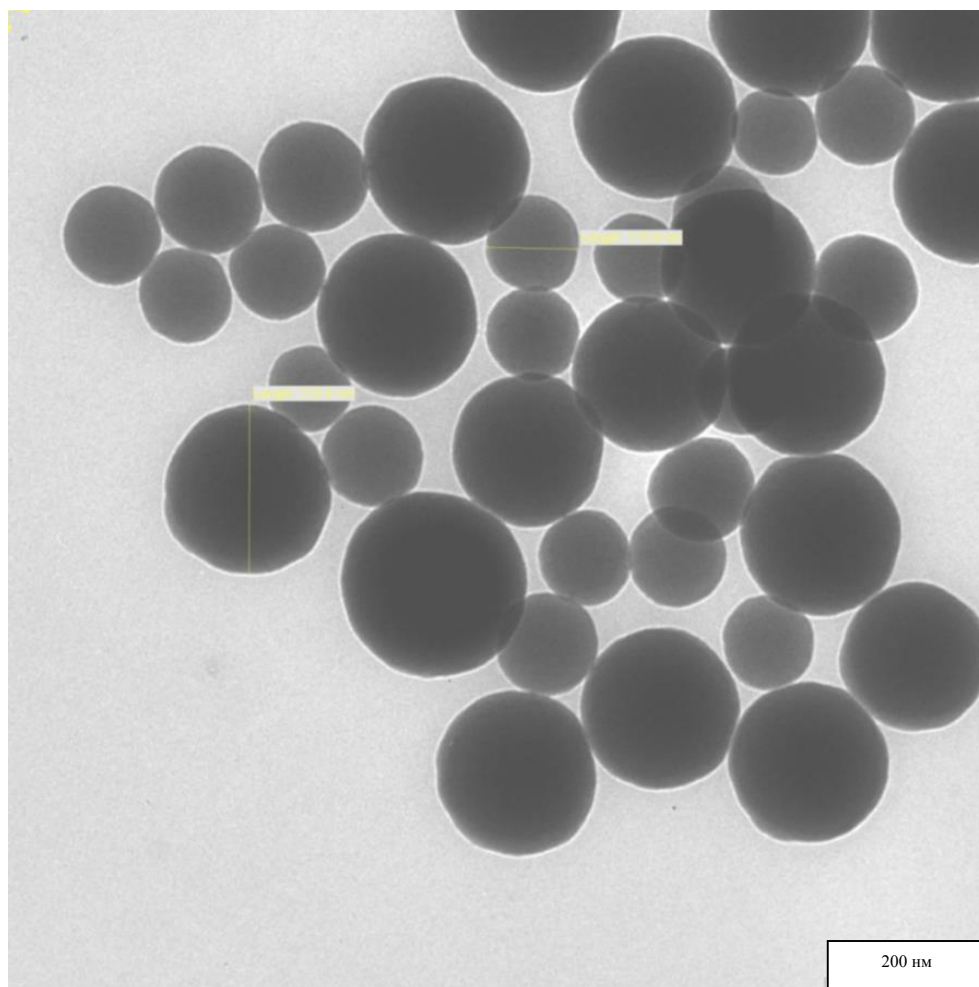


Рисунок 2 – Изображение силикатных наночастиц, полученных методом Штобера без использования ПАК (ПЭМ, масштабная метка 200 нм)

Увеличение концентрации ПАК приводит к увеличению центров конденсации и, тем самым, к уменьшению среднего размера силикатных частиц. Например, на рисунке 2,б показано электронно-микроскопическое изображения частиц, полученных при добавлении 5 мг ПАК в реакционную смесь. Было замечено, что изменение протокола реакции с четырехчасовой инъекции на одномоментное добавление всего раствора приводит к формированию агрегированного коллоида (рисунок 3).

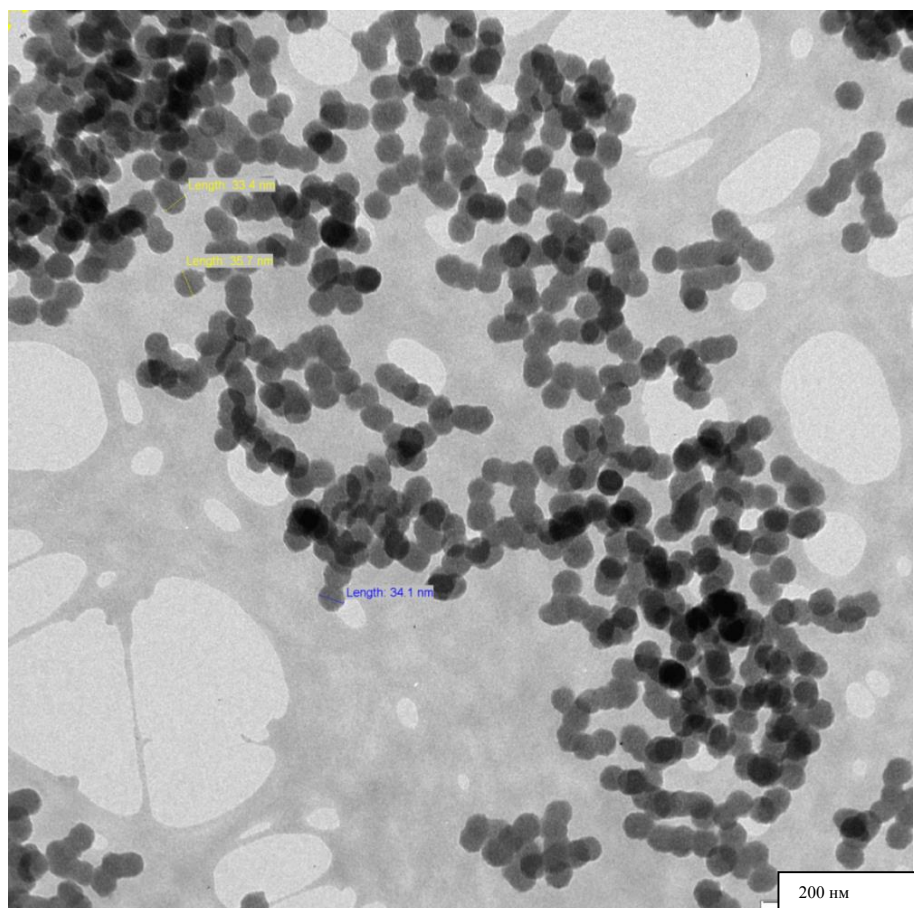
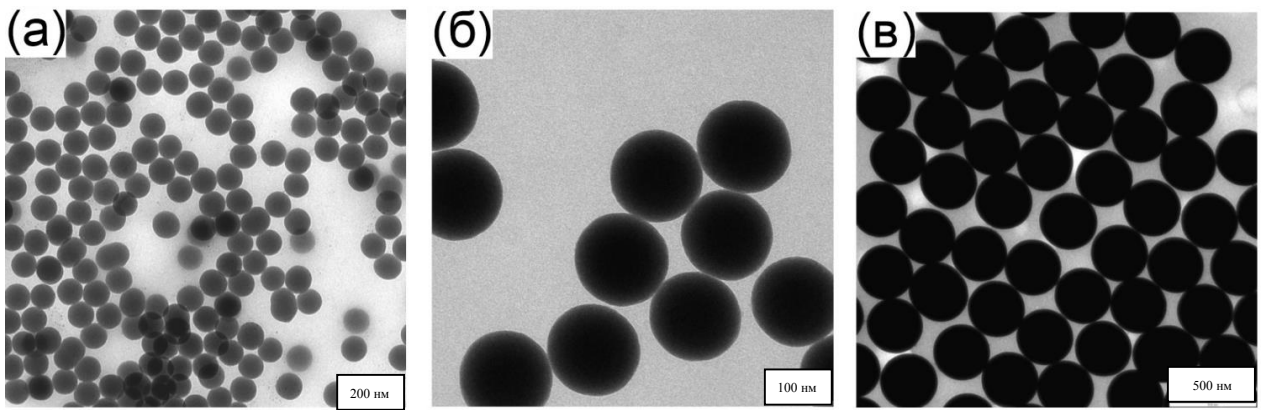


Рисунок 3 – Изображение агрегированных силикатных «зародышей», получаемых при одномоментном добавлении ТЭОС в реакционный раствор (ПЭМ, масштабная метка 200 нм)

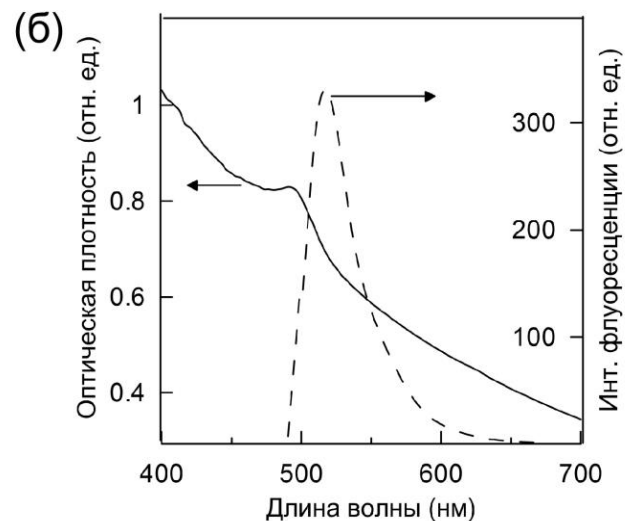
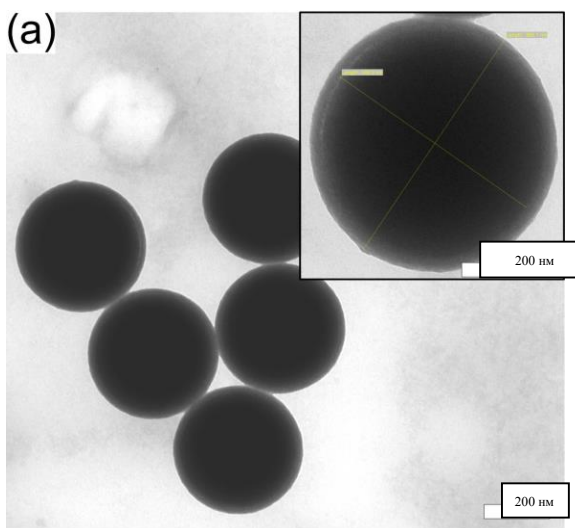
На следующем этапе была выполнена методики перероста «зародышевых» частиц до требуемого размера. С помощью 2 стадий мы получили монодисперстный раствор наночастиц с диаметром 302 нм. В качестве первичных «зародышей» мы использовали предыдущие частицы меньшего размера (рисунок 4).



а - наночастицы с диаметром 80 ± 3 (масштабная метка 200 нм),
 б - наночастицы с диаметром 176 ± 7 (масштабная метка 100 нм),
 в - наночастицы с диаметром 302 ± 20 (масштабная метка 500 нм)

Рисунок 4 – ПЭМ-изображение силикатных наночастиц, полученных на каждом этапе перероста

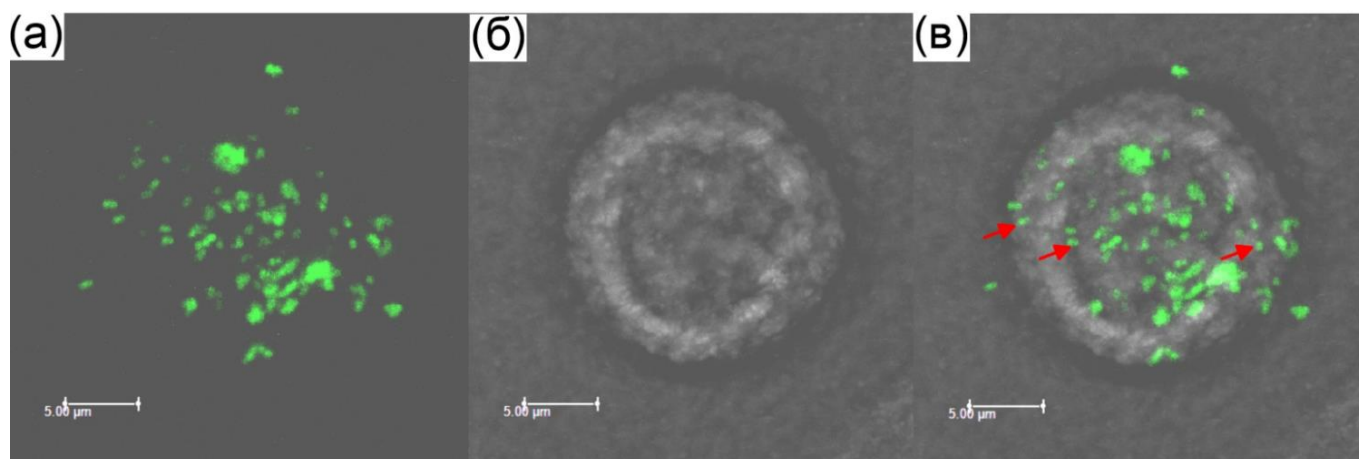
Синтез флуоресцентных наночастиц. Мы синтезировали наночастицы с включенными флуоресцентными молекулами. Методика синтеза включала добавление в реакционную смесь конъюгированного с аminosиланом красителя (флуоресцин изотиоционат, ФИТЦ) во время прерывающегося роста силикатных наночастиц (рисунок 5).



а – электронно-микроскопическое изображение (масштабная метка 200 нм);
 б – спектр оптической плотности и интенсивности флуоресценции

Рисунок 5 – Физические характеристики силикатных наночастиц, конъюгированных с ФИТЦ

Для проведения синтеза были взяты наночастицы с размером 302 нм. Средний размер полученных частиц равнялся 400 нм. На увеличенном изображении частицы можно обнаружить поверхностный флуоресцентный слой толщиной около 40 нм. Инкорпорация флуоресцентных молекул не приводила к повышению степени полидисперсности, агрегации частиц, и не влияла на их способность выступать в качестве зародышей для дальнейшего перероста. На рисунке 5 изображены спектры оптической плотности и флуоресценции полученных композитных частиц. Было рассчитано что между молекулами красителя 12,7 нм. При таких расстояниях эффект концентрационного тушения флуоресценции маловероятен. Яркость единичной метки достаточна для визуализации единичных частиц. Мы провели эксперимент с раковыми клетками линии HeLa, чтобы подтвердить данное свойство.



а - флуоресцентное изображение наночастиц (масштабная метка 5 мкм);
б - фазово-контрастное изображение клетки линии HeLa (масштабная метка 5 мкм);
в - наложение полученных изображений (масштабная метка 5 мкм);
стрелками показано изображение единичных частиц

Рисунок 6 – Изображения, полученные после инкубации клетки линии HeLa с флуоресцирующими силикатными наночастицами

На рисунке 6 представлено изображение раковой клетки HeLa, которое было получено с помощью фазового-контраста. В самой клетке были обнаружены флуоресцентные силикатные наночастицы, и их изображение было получено с помощью флуоресцентного режима на микроскопе. Для

демонстрации этих НЧ мы наложили два полученных изображения друг на друга.

Синтез силикатных наночастиц конъюгированных индоцианином зеленым. Мы функционализировали СНЧ с фотосенсибилизатором индоциановым зеленым (рисунок 7,8).

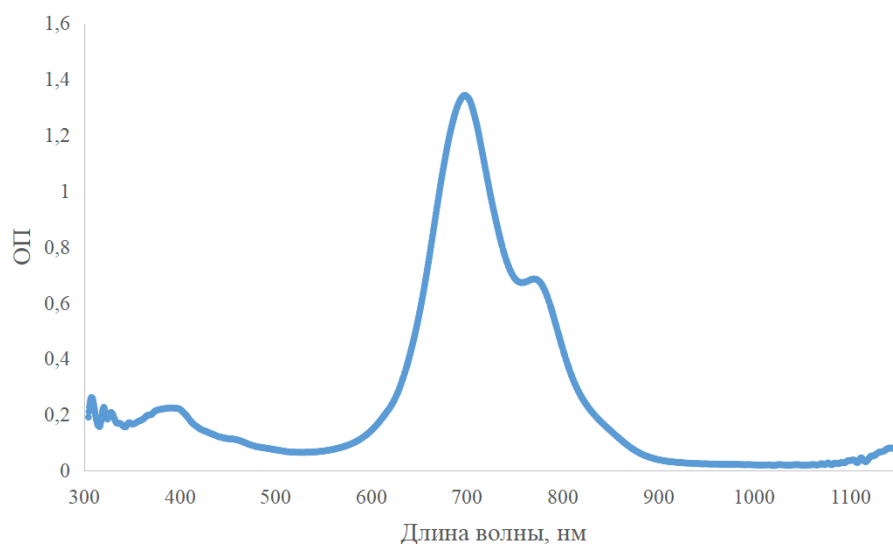
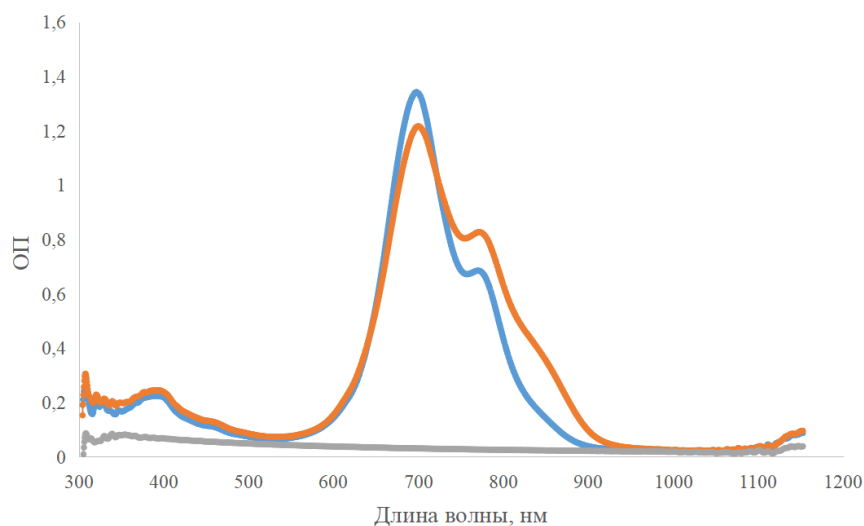


Рисунок 7 – Спектр оптической плотности индоцианина зеленого



серая линия - силикатные наночастицы,
синяя линия - индоцианин зеленый, оранжевая линия - силикатные наночастицы
конъюгированные с индоцианином зеленым

Рисунок 8 – Общий спектр оптической плотности.

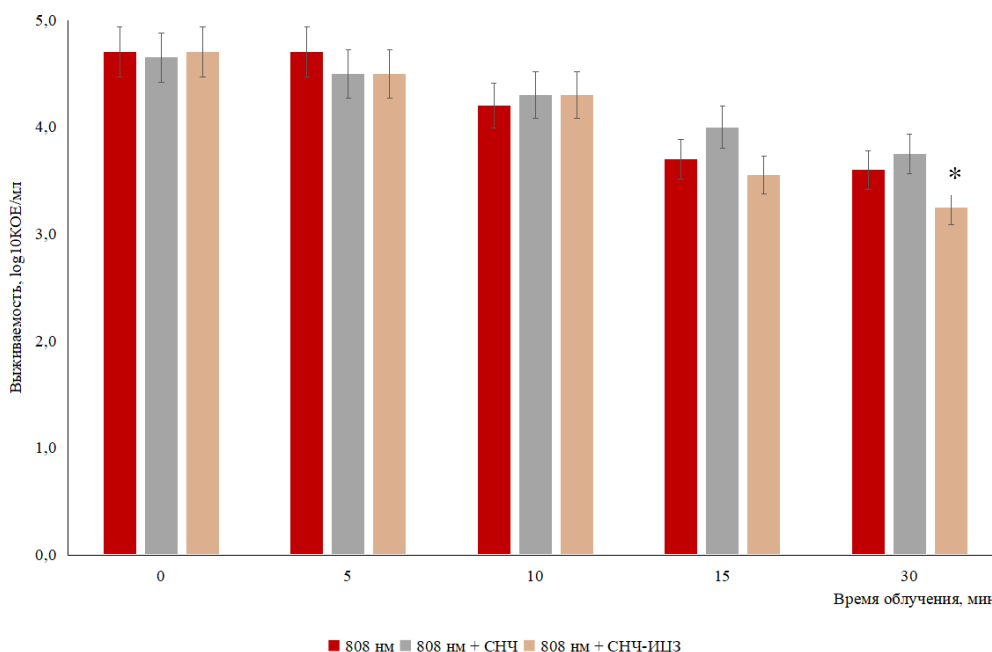
Был снят общий спектр на котором видно, что краситель был успешно конъюгирован с наночастицей. Есть основной пик на 700 нм, дополнительный на 770 нм и третий на 840 нм, краситель образовал тример.

Проверка антибактериальных свойств силикатных наночастиц конъюгированных индоцианином зеленым

На рисунке 9 продемонстрировано воздействие ИК НИЛИ на микроорганизм *S. aureus* 209 P. Из графика видно, что силикатные наночастицы подвергшиеся ИК излучению не вызывают значительного снижения \log_{10} КОЕ в сравнении с простым использованием инфракрасного лазера. Это может говорить о возможном рассеивании ИК излучения силикатными наночастицами, что в результате приводит к более низким значениям снижения популяции. При воздействии силикатных наночастиц конъюгированных с индоцианином наблюдается снижение популяции клеток на 1,4 \log_{10} КОЕ после 30 минут облучения.

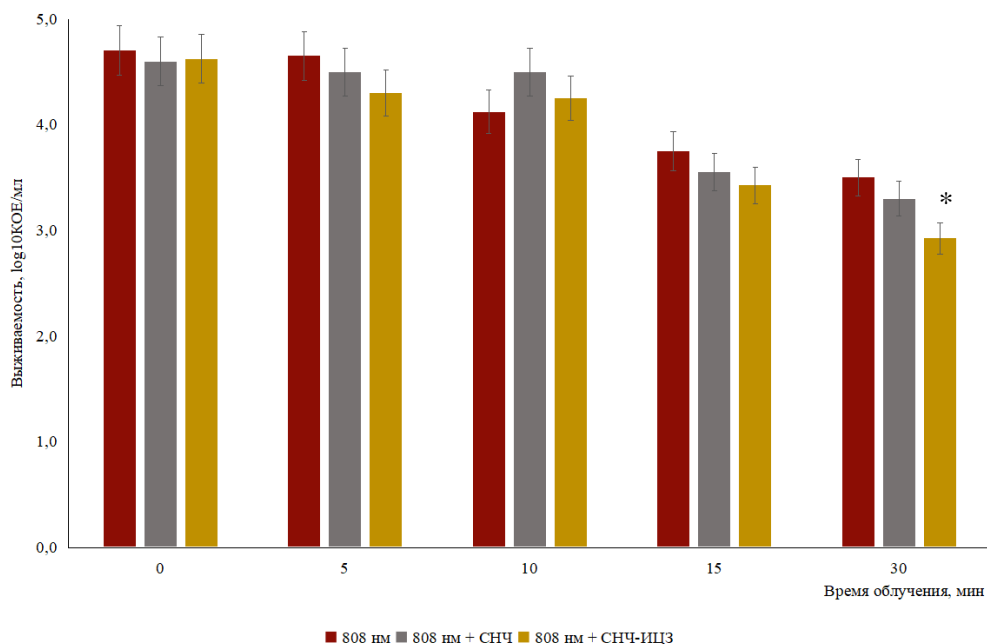
После проведения данного эксперимента, мы решили увеличить мощность лазера и исследовать, как данное изменение повлияет на результаты. На рисунке 10 представлено воздействие ИК НИЛИ на микроорганизм *S. aureus* 209 P при увеличенной мощности лазера до 100 мВт/см². После 30 минут облучения ИК лазером СНЧ не вызывают значительного снижения \log_{10} КОЕ в сравнении с простым использованием инфракрасного лазера.

Если оценивать воздействие силикатных наночастиц, конъюгированных с индоцианином, то на графике видно, что происходит снижение выживаемости на 1,7 \log_{10} КОЕ.



* - достоверные различия между данными

Рисунок 9 – Изменение численности микроорганизмов *S. aureus* 209 P при комбинированном действии ИК НИЛИ с длиной волны 808 нм (50 мВт/см²) и силикатных наночастиц конъюгированных с индоцианином зеленым



* - достоверные различия между данными

Рисунок 10 – Изменение численности микроорганизмов *S. aureus* 209 P при комбинированном фототермическом действии ИК НИЛИ с длиной волны 808 нм (100 мВт/см²) и силикатных наночастиц конъюгированных с индоцианином зеленым

Исследование температурных изменений суспензий клеток *S. aureus* при комплексном действии лазерного инфракрасного излучения и силикатных наночастиц

Фотовоздействие на суспензии *S. aureus* проводилось с измерением температуры после каждого облучения. Полученные данные показывают достоверное повышение температуры при облучении ИК-лазером у все имеющихся смесей. Поскольку нас интересовало, имеются ли отличия между нагревом при использовании различных мощностей лазера, в таблице приведены значения полученные в результате воздействия двух мощностей: 50 мВт/см² и 100 мВт/см² на бактериальные взвеси (таблица 1).

Таблица 1 – Изменение температуры бактериальных взвесей при воздействии инфракрасного лазерного излучения

Время, мин	Т°С							
	50 мВт/см ²				100 мВт/см ²			
	Физ р-р	СНЧ	ИЦЗ	СНЧ+ ИЦЗ	Физ р-р	СНЧ	ИЦЗ	СНЧ+ ИЦЗ
0	1	0	0	0,7	4	3,3	3,7	4
5	5	5,7	5,7	5,3	8	9,7	9,7	8
10	6,7	7,7	7,7	7,3	9,3	11,3	11,3	9
15	8,3	9	9	8,3	10,3	12,3	11,7	9,3
30	9,3	10,3	10,3	9,7	11	13,3	13	9,7
ΔТ°С	8,3	10,3	10,3	9	7	10	9,3	5,7
$\frac{\Delta T_{p-p}}{\Delta T_{ИК}}$, °С	0	2	2	1,3	0	3	2,3	-1,3

При действии лазерного ИК (808 нм) излучения на контрольную взвесь в течение 30 мин температура изменилась примерно примерно на 1,3°С (50 мВт/см²) и на 1°С (100 мВт/см²). При облучении суспензий при мощности лазера 50 мВт/см² наблюдается нагрев на 8,3°С в физ растворе, на 10,3°С вместе с силикатными частицами, на 10,3°С с индоцианином зеленым и на 9°С при использовании конъюгированных СНЧ с индоцианином. В другом эксперименте

мы наблюдаем, что при использовании мощности лазера 100 мВт/см^2 наблюдается нагрев на 7°C в физ растворе, на 10°C вместе с силикатными частицами, на $9,3^\circ\text{C}$ с индоцианином зеленым и на $5,7^\circ\text{C}$ при использовании конъюгированных силикатных наночастиц с индоцианином.

В результате локального нагрева сразу несколькими близлежащими наночастицами происходит повреждение клеточной стенки и мембраны бактерии. Нагрев СНЧ, при воздействии на них ИК лазером, был невелик, поэтому стоит говорить о фотодинамическом, а не о фототермическом процессе, влияющем на антибактериальные свойства функционализированных СНЧ.

Заключение

1 Было выявлено, что полиакриловая кислота способствует снижению размера силикатных наночастиц с 170 нм до 29 нм . Продемонстрировано, что она влияет на образование монодисперсного раствора наночастиц, благодаря взаимодействию с аммиаком, которое не приводит к вторичному «зародышообразованию».

2 При функционализации силикатных наночастиц с помощью флуоресцентного красителя флуоресцина изотиоционата, было продемонстрировано свойство полученных нами частиц выступать в виде флуоресцентных меток, которое в дальнейшем может быть использовано в различных сферах науки.

3 Установлено, что силикатные наночастицы, подвергшиеся ИК излучению, не оказывают значительное ингибирующее воздействие на рост бактерий *S. aureus* 209 P в сравнении с использованием ИК лазера. Это может говорить о том, что силикатные частицы рассеивают часть попадающего на них излучения, и поэтому не обладают выраженным антибактериальным эффектом.

4 Было продемонстрировано, что комплексное взаимодействие инфракрасного излучения и силикатных наночастиц, конъюгированных с индоцианином зеленым, снижает популяцию клеток на $1,4 \log_{10} \text{ КОЕ}$

(мощность лазера 50 мВт/см^2) и на $1,7 \log_{10} \text{ КОЕ}$ (мощность лазера 100 мВт/см^2)

