

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ НАНОЧАСТИЦ ДИОКСИДА КРЕМНИЯ

Косян Д.Б.¹, Макаева А.М.¹, Русакова Е.А.¹

¹ФГБНУ «Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий Российской академии наук», Оренбург, e-mail: vniims.or@mail.ru

Повышенный интерес исследователей к нанообъектам вызван их необычными физическими и химическими свойствами, особенностями биологического действия, которые часто радикально отличаются от свойств этого же вещества в форме сплошных фаз или макроскопических дисперсий. В последнее время это касается наноматериалов из наноструктурированных частиц диоксида кремния (НЧ SiO₂) в виде аморфной (кремнезем) или кристаллической (кварц) модификации. Поскольку нет единого мнения о токсическом действии данного вещества, уместным является проведение исследований для оценки его биологического действия на клетку. В работе использованы НЧ SiO₂, оценены их физико-химические характеристики. Для оценки биологического действия НЧ SiO₂ были использованы генно-модифицируемые штаммы (*lux*-биосенсоры) с конститутивным и индуцибельным типами свечения. Микробиологическое тестирование проводилось дополнительно для более точной оценки потенциального бактерицидного действия НЧ SiO₂. По результатам оценки физико-химических характеристик было выявлено, что наночастицы SiO₂ в водной суспензии образуют три фракции с различными показателями параметра размеров. В частности, из наночастиц SiO₂ только 23% частиц диспергируются в водной суспензии до размеров $57 \pm 8,5$ нм, большая часть (72%) образует комплексы, имеющие диаметр 168 ± 38 нм. Оценка степени активности наночастиц SiO₂ при разных экспозициях (60, 120 мин) контакта с клетками *E.coli* K12 TG1 с клонированными *luxCDABE*-генами *P.leiognathi* 54D10 («Эколюм») показала, что данное вещество в концентрациях от 0,1 до 0,000195 М не приводило к изменению динамики бактериальной биолюминесценции. Данные по оценке кинетики свечения штамма *Escherichia coli* K12 MG1655 pkatG'::*lux* полностью коррелируют с данными, полученными при тестировании штамма *Escherichia coli* K12 MG1655 psoxS'::*lux* и не демонстрируют негативного действия. Микробиологический тест подтверждает полученные результаты.

Ключевые слова: биологическая активность, наноматериалы, диоксид кремния, токсичность, *lux*-биосенсоры.

THE BIOLOGICAL EFFECTS OF NANOPARTICLES OF SILICON DIOXIDE

Kosyan D.B.¹, Makaeva A.M.¹, Rusakova E.A.¹

¹FGBNU "Federal Research Centre of Biological Systems and Agro-technologies of the Russian Academy of Sciences", Orenburg, e-mail: vniims.or@mail.ru

The increased interest of researchers to nanoobjects is caused by their unusual physical and chemical properties, features of biological action, which are often radically different from the properties of the same substance in the form of continuous phases or macroscopic dispersions. Recently, this applies to nanomaterials of nanostructured particles of silicon dioxide (NF SiO₂) in the form of amorphous (silica) or crystalline (quartz) modification. Since there is no consensus on the toxic effects of this substance is appropriate to conduct research to assess its biological effects on the cell. In this paper, we used SiO₂ LF, evaluated their physical and chemical characteristics. Genetically modified strains (*lux*-biosensors) with constitutive and inducible types of luminescence were used to assess the biological effect Of SiO₂ NPS. Microbiological testing was additionally carried out to more accurately assess the potential bactericidal effects Of SiO₂ NPS. Based on the evaluation of physical and chemical characteristics, it was found that SiO₂ nanoparticles in aqueous suspension form three fractions with different size parameters. In particular, only 23% of SiO₂ nanoparticles are dispersed in aqueous suspension to the size of 57 ± 8.5 nm, most (72%) form complexes having a diameter of 168 ± 38 nm. Assessment of the degree of activity of nanoparticles of SiO₂ at different exposures (60, 120 min) contact with the cells of *E. coli* K12 TG1 with cloned *luxCDABE* genes *P. leiognathi* 54D10 ("Ekolyum") showed that this substance in concentrations from 0.1 to 0,000195 M does not lead to the evolution of bacterial bioluminescence. Data for the evaluation of the kinetics of the luminescence of the strain *Escherichia coli* K12 MG1655 pkatG'::*lux* fully correlated with the data obtained when testing strain *Escherichia coli* K12 MG1655 psoxS'::*lux*, and do not demonstrate negative actions. The microbiological test confirms the results.

Keywords: biological activity, nanomaterials, silicon dioxide, toxicity, *lux*-biosensors.

Последние десятилетия создали предпосылки для управления рядом нанообъектов

благодаря развитию многих отраслей науки и техники. Это стало возможным благодаря появлению частиц, которые обладают функционально значимыми свойствами и являются предметом изучения недавно появившейся области – нанотехнологии [1].

Наночастицы (НЧ) имеют размеры, сопоставимые с биомолекулами, поэтому могут быть созданы таким образом, чтобы позволили обеспечить наличие необходимых свойств. Например, используются наноматериалы с модифицированными поверхностями за счет прикрепления различных полимеров. Это позволяет увеличить совместимость вещества и биомолекулы и обеспечить селективную доставку [2; 3]. Сейчас известно о ряде таких нановеществ, которые тестируются либо приняты американским фармакологическим комитетом FDA (например, НЧ Fe_2O_3) [4].

В последнее время особое внимание приковано к наноструктурированным частицам диоксида кремния (НЧ SiO_2) в виде кварца [5; 6] или кремнезема [7; 8]. Эти вещества рассматриваются как перспективный, биосовместимый и биodeградируемый материал, который способен проникать на клеточном и молекулярном уровнях и может использоваться для разработки лекарственных препаратов и диагностических средств [9]. Это возможно потому, что по форме частицы близки к сфере, а размер варьирует от 5 до 80 нм, что создает благоприятные условия для их модификации. Также при попадании в организм НЧ SiO_2 быстро разрушаются в органах выведения до ортокремниевой кислоты и выводятся с мочой, что говорит об их возможной инертности [10]. Однако постоянно появляются новые данные об имеющемся токсическом действии НЧ SiO_2 . Последние исследования показывают, что при определенных концентрациях возможен негативный эффект на клетки человека, например, при дозе выше 190 мкг/мл наблюдается токсическое действие на культуру клеток человека, а при введении НЧ SiO_2 мышам внутрь брюшины в дозе 50 мкг/кг отмечена активация перитонеальных макрофагов [11]. Таким образом, требуются дополнительные исследования биологического действия данных наночастиц.

Цель исследования: оценить биологический эффект наночастиц диоксида кремния.

Материалы и методы исследования

Экспериментальные исследования в лабораториях микробиологии и молекулярной генетики Испытательного центра ФГБНУ «Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий РАН».

Работа включала комплексную физико-химическую и биологическую оценку наночастиц диоксида кремния в условиях *in vitro*.

В качестве исследуемых нанолекарств выступали наночастицы диоксида кремния (НЧ SiO_2) («Передовые порошковые технологии», Томск).

Исследование физико-химических характеристик наночастиц включало оценку дзета-потенциала с использованием анализатора наночастиц Photocor Compact («Фотокор», Россия), а также размеров, формируемых в водной среде агрегатов наночастиц с помощью метода динамического светорассеивания.

Для визуализации наночастиц использовали атомно-силовой микроскоп Certus Light (Nanoscan technology, Россия) экипированный кантилеверами NSG 10 с жесткостью балки 37,6 N/m и радиусом зонда <10 нм (Tips Nano, Estonia). Сканирование проводили в воздушной среде в режиме прерывистого контакта.

Предварительно наночастицы диоксида кремния подвергались ультразвуковому воздействию на диспергаторе (f-35 кГц, N-300 Вт, A-10 мкА) в течение 30 минут. Размер наночастиц определяли с использованием электронного микроскопа JSM-740 IF.

Для дальнейших исследований приготавливалась серия последовательных разведений от 4 М до $0,1 \cdot 10^{-9}$ М.

Биологическая оценка действия НЧ SiO₂ проводилась с использованием генно-модифицируемых штаммов (*lux*-биосенсоры) с конститутивным и индуцибельным типами свечения.

В варианте конститутивного характера свечения был использован штамм *E. coli* K12 TG1 pF1, содержащий плазмиду pF1 с кассетой *luxCDABE*-генов *Vibrio fischeri* МГУ-6, производство НВО «Иммунотех» (Россия, Москва) в лиофилизированном состоянии под коммерческим названием «Эколюм». Для проведения биотестирования лиофилизированный препарат «Эколюм» был регидратирован с помощью дистиллированной воды в объеме 5 мл, охлажденной до 8 °С, после чего выдержан при 2-4 °С в течение 30 мин. Перед проведением исследований бактериальная суспензия стандартизовалась до ОП₄₅₀=0,45 ед. Затем в лунки планшета смешивали НЧ SiO₂ (100 мкл) и суспензию люминесцирующих бактерий (100 мкл) в соотношении 1:1.

В варианте индуцибельного характера бактериального свечения были использованы штамм *Escherichia coli* K12 MG1655 pkatG':*lux* (для детекции перекиси водорода), а также *Escherichia coli* K12 MG1655 psoxS':*lux* (для детекции супероксид-аниона).

Используемые для этого *lux*-биосенсоры культивировали при 37 °С на LB-агаре с 100 мкг/мл ампициллина, после чего дополнительно подращивали в LB-бульоне до достижения ранней log-фазы и суспендировали в 0,5%-ном растворе NaCl до достижения ОП₄₅₀=0,05 ед. Полученные суспензии в объеме по 50 мкл вносили в лунки планшета, содержащие по 50 мкл предварительно подготовленных разведений НЧ (см. выше), выдерживали 15 мин для формирования повреждающего эффекта, после чего дополнительно вносили по 100 мкл LB-

бульона, содержащего трофические субстраты для энергетического обеспечения биолюминесценции.

Для доказательства работоспособности индуцибельных штаммов использовались специфические химические воздействия, вызывающие индукцию стрессовых генов: штамм *E. coli* K12 MG1655 $\text{pkatG}'::\text{lux}$ и $\text{psoxS}'::\text{lux}$ – подвергали воздействию перекиси водорода и метилвиологена (параквата). Расчет индекса индукции (ИИ) биолюминесценции проводили по формуле, аналогичной расчету ИТ.

Проведение теста ингибирования бактериальной люминесценции осуществлялось в измерительном блоке микропланшетного анализатора Infinite PROF200 (TECAN, Австрия).

Регистрация интенсивности свечения полученных смесей осуществлялась в течение 180 мин с интервалом 5 мин. Результаты влияния НЧ диоксида кремния на интенсивность бактериальной биолюминесценции оценивали с использованием следующей формулы:

$$I = \frac{Ik_{\text{Омин}} \times Io_{\text{пмин}}}{Ik_{\text{пмин}} \times Io_{\text{Омин}}},$$

где Ik и Io – это показатели интенсивности свечения контрольных и опытных проб на 0-й и n -й минутах измерения.

Определялись 3 пограничных уровня токсического действия:

1. 0-20 - образец не токсичен.
2. 20-49 - образец слабо токсичен.
3. 50-100 - образец токсичен.

На основании полученных данных рассчитывали величины токсикологического параметра EC50, соответствующие концентрациям НЧ диоксида кремния, вызывающим 50%-ное подавление свечения *lux*-биосенсоров по сравнению с контролем.

Микробиологическое тестирование проводилось дополнительно для более точной оценки потенциального бактерицидного действия НЧ SiO₂. Для этого была использована суточная культура нелюминесцирующего штамма *E. coli* K12 TG1. Штамм выращивался на твердой питательной среде (LB-агар) при 37 °С в течение 18-24 часов. Далее была приготовлена суспензия микроорганизмов в деионизированной воде с оптической плотностью ОП₄₅₀=0,5 ед. После этого бактериальная суспензия смешивалась с водными суспензиями НЧ (1:1), из которых готовилась серия 10-кратных разведений в объеме 50 мкл и высевались на поверхность LB-агара.

Контролем выступала проба, содержащая клетки бактерий, смешанные в аналогичных пропорциях с деионизированной водой. Далее пробы культивировались в течение 24-48 ч при 37 °С. Затем проводили подсчет колоний и на основании полученных результатов оценивали наличие и выраженность (%) бактерицидного эффекта НЧ SiO₂.

Все эксперименты были проведены в 3 повторностях. Полученные результаты

обрабатывались с использованием компьютерной программы Statistica 10.0, а также пакета программ Microsoft Excel. Для расчета применялся критерий энтропии Шеннона. Достоверность оценивалась при вероятности ошибки $p \leq 0,05$, высокозначимыми считали различия при $p \leq 0,01$ и $p \leq 0,001$.

Результаты исследования и их обсуждение

Результаты аттестации препарата наночастиц выявили различные физико-химические характеристики. Порошок нанопрепаратов диоксида кремния содержал 99,8% SiO₂ и порядка 0,2% Cl₂; форма соответствовала сфере. Согласно паспорту препаратов размер частиц составлял 40,9±10 нм. Удельная поверхность составляла для SiO₂(I) 109 м²/г.

Поскольку заявленные физико-химические параметры нанопрепарата несколько отличаются от реальных, было проведено дополнительное тестирование заявленных веществ с целью объективной оценки их функциональной активности.

По данным динамического рассеяния света наночастицы SiO₂ в водной суспензии образуют три фракции с различными показателями параметра размеров (табл. 1).

Таблица 1

Основные физические параметры наночастиц SiO₂

Препарат	Фракция, %	Диаметр, нм	Дзета-потенциал, мВ
SiO ₂	23	57 ± 8.5	-25.13 ± 0.33
	72	168 ± 38	
	15	> 1500	

В частности, выявлено, что из наночастиц SiO₂ только 23% частиц диспергируются в водной суспензии до размеров 57 ± 8,5 нм, большая часть (72%) образует комплексы, имеющие диаметр 168 ± 38 нм. Около 15% формируют крупные конгломераты диаметром >1500 нм. В свою очередь, дзета-потенциал нанопрепарата диоксида кремния характеризовался отрицательным значением, не превышающим 25 мВ.

Оценка степени активности наночастиц SiO₂ при разных экспозициях (60, 120 мин) контакта с клетками *E.coli* K12 TG1 с клонированными *luxCDABE*-генами *P.leiognathi* 54D10 («Эколюм») показал, что данное вещество в концентрациях от 0,1 до 0,000195 М не приводило к изменению динамики бактериальной биолюминесценции. Увеличение концентрации до 4 М отмечалось проявлением биологической активности наночастиц SiO₂ (I), выражающейся в 30%-ном ингибировании свечения клеток, тем не менее можно характеризовать данные дозировки как слабо токсичные или не токсичные (рис. 1).

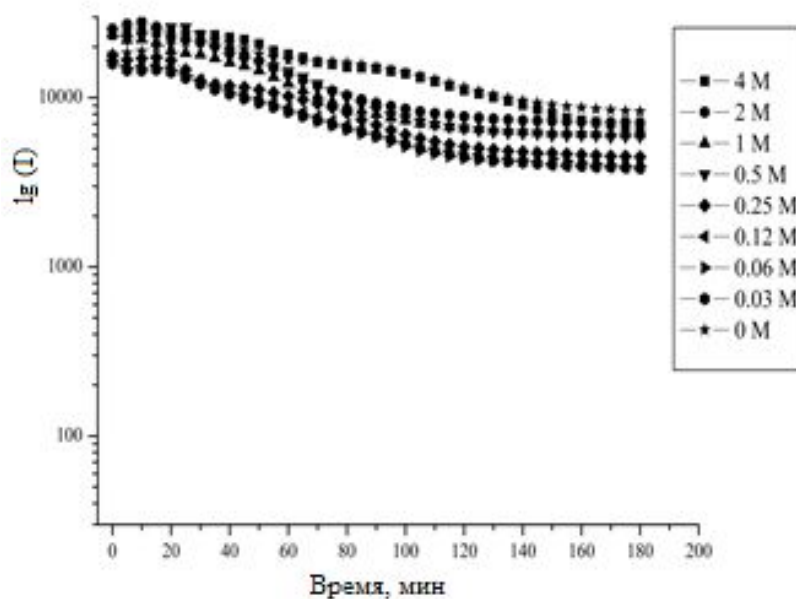


Рис. 1. Динамика свечения *E.coli* K12 TG1 с клонированными *lux* CDABE-генами *P.leiognathi* 54D10 при контакте с наночастицами SiO_2 в различных концентрациях

Анализ параметра «доза-эффект» также не выявил явного токсического действия исследуемого нанопрепарата (табл. 2)

Таблица 2

Степень сохранности клеток *E. coli* на 120-й минуте теста биолюминесценции

время, мин	Концентрация, М										
	,0000 4	,0001	,0002	,0005	,001	,003	,006	,0125	,025	,05	,1
20	,93±0 ,13	,89±0 ,32	,86±0 ,18	,84±0 ,23	,84± 0,5	,87±0 ,27	,88±0 ,44	,85±0 ,03	,83±0 ,11	,80±0 ,08	,79±0 ,14

Согласно данным вышеуказанной таблицы можно определить весь диапазон концентраций биологически инертным в рамках летального исхода клетки. Все значения находились в пределах значения контроля, а расхождения были незначительными. Оценка данных *lux*-биосенсоров не позволили зафиксировать развивающееся во времени дозозависимое подавление свечения, поскольку токсический эффект не достигал уровня EC50.

Таким образом, на этапе оценки потенциального негативного действия исследуемого вещества не было зарегистрировано острой токсичности.

Однако для наночастиц характерно выраженное окислительное действие, поэтому на втором этапе проведения биолюминесцентного тестирования нами были проведены серии

экспериментов для оценки потенциального воздействия свободных форм кислорода на бактериальные клетки. Для этого оценивался токсический эффект и возможность окислителя инициировать индукцию промотора окислительного стресса.

Оценка кинетики свечения штамма *Escherichia coli* K12 MG1655 psoxS':lux при воздействии наночастиц диоксида кремния в различных концентрациях не выявила явно выраженного окислительного действия. Весь ряд разведений находится в диапазоне фонового свечения контрольного образца. При этом пик свечения принадлежит именно этому образцу. Все исследуемые концентрации подобного уровня не достигали, отличаясь на 20-25% в среднем в сторону уменьшения. Незначительные отличия касаются более низких концентраций.

Данные по оценке кинетики свечения штамма *Escherichia coli* K12 MG1655 pkatG':lux полностью коррелируют с данными, полученными при тестировании штамма *Escherichia coli* K12 MG1655 psoxS':lux (рис. 2 а, б).

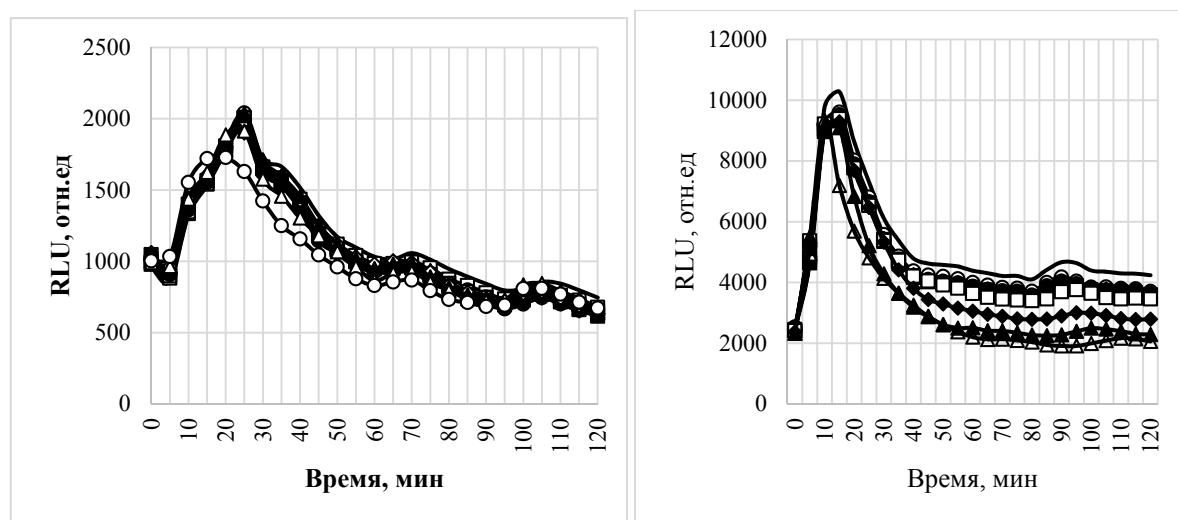


Рис. 2: а) кинетика свечения штамма *Escherichia coli* K12 MG1655 psoxS':lux при воздействии НЧ SiO₂; б) кинетика свечения штамма *Escherichia coli* K12 MG1655 pkatS':lux при воздействии НЧ SiO₂

Результаты, полученные с использованием lux-биосенсоров с индуцибельным характером бактериального свечения, подтвердили полученные ранее эффекты и позволили констатировать отсутствие характера окислительного действия. Не было выявлено, что индукция свечения обусловлена действием супероксид-аниона, который образовался в результате контакта наночастиц с бактериальной клеткой и способствовал гибели тест-организма при высоких концентрациях анализируемого вещества.

Описанные выше эффекты стали основой для последующей оценки жизнеспособности (табл. 3) в клетках *E.coli*, подвергнутых стрессовому воздействию после

предварительной инкубации в контакте с НЧ SiO₂.

Таблица 3

Влияние НЧ SiO₂ на сохранение жизнеспособности клеток *E.coli*

Концентрация НЧ SiO ₂ , М	Остаточное количество КОЕ (в % к контролю)
0,1	93,37±2,5*
0,05	93,34±1,8
0,025	95,93±0,9*
0,0125	95,45±1,3
0,006	96,02±1,1
0,003	96,89±2,1
0,001	97,31±0,9
0,0005	97,74±4,3**
0,0002	97,87±7,6*
0,0001	98,31±1,1
0,00005	97,01±1,7
Контроль	100

Примечание: * – p < 0,05; ** – p < 0,01.

Заключение

Проведенные исследования демонстрируют низкую токсичность данной наночастицы. Показано, что взаимодействие НЧ SiO₂ с клетками бактерий не вызывает негативного действия, что подтверждено рядом тестов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования (Грант президента МК-3631.2017.11).

Список литературы

1. Sahoo S. Socio-ethical issues and nanotechnology development: perspectives from India, in 2010. 10th IEEE Conference on Nanotechnology (IEEE-NANO) (USA, 17–20 August 2010 (IEEE, 2010)), Seoul, 2010. P. 1205–1210.
2. Yadav V. Nanotechnology, big things from a tiny world: a review. AEEE. 2013. vol 3. no 6. P. 771–778.
3. Pelling A.E., Dawson D.W., Carreon D.M., Christiansen J.J., Shen R.R., Teitell M.A., Gimzewski J.K. Distinct contributions of microtubule subtypes to cell membrane shape and stability. Nanomedicine. 2007. Vol. 3. No 1. P. 43–52.
4. Андреева Е.Р., Рудимов Е.Г., Горностаева А.Н. Взаимодействие кремнийсодержащих наночастиц с лейкоцитами периферической крови человека: исследование in vitro // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2013. Т. 155. №3. С. 377-380.

5. Дурнев А.Д., Соломина А.С., Даугель-Дауге Н.О., Жанатаев А.К., Шредер Е.Д., Немова Е.П., Шредер О.В., Велигура В.А., Осминкина Л.А., Тимошенко В.Ю., Середенин С.Б. Исследование генотоксической и тератогенной активности нанокристаллов кремния. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2010. Т. 149. №4. С. 429-433.
6. Ahamed M. Silica nanoparticles-induced cytotoxicity, oxidative stress and apoptosis in cultured A431 and A549 cells. Hum. Exp. Toxicol. 2013. Vol. 32. No 2. P. 186–195.
7. Ekkapongpisit M., Giovia A., Follo C., Caputo G., Lsidoro C. Biocompatibility, endocytosis, and intracellular trafficking of mesoporous silica and polystyrene nanoparticles in ovarian cancer cells, effects of size and surface charge groups. International Journal of Nanomedicine. 2012. Vol 7. P. 4147–4158.
8. Осминкина Л.А., Лукьянова Е.Н., Гонгальский М.Б., Кудрявцев А.А., Гайдарова А.Х., Полтавцева Р.А., Тимошенко В.Ю., Кашкаров П.К., Сухих Г.Т. Влияние наноструктурированного кремния на процессы пролиферации стволовых и раковых клеток // Бюллетень экспериментальной биологии. 2011. Т.151. №1. С.91-95
9. Колесниченко А.В., Тимофеев М.А., Протопопова М.В. Токсичность наноматериалов – 15 лет исследований // Российские нанотехнологии. 2008. Т. 3. №3-4. С. 54-61.
10. Huang X., Zhang F., Wang H., Niu G., Choi K.Y., Swierczewska M., Zhang G., Gao H., Wang Z., Zhu L., Choi H.S., Lee S., Chen X. Mesenchymal stem cell-based cell engineering with multifunctional mesoporous silica nanoparticles for tumor delivery. Biomaterials. 2013. Vol.34. no 7. P. 1772-1780.
11. Ogneva I.V., Maximova M.V., Larina I.M. Structure of cortical cytoskeleton in fibers of mouse muscle cells after being exposed to a 30-day space flight on board the BION-M1 biosatellite. J. Appl. Physiol. 2014. Vol.116. no 10. P.1315-1323.