

Министерство образования Республики Беларусь
Учреждение образования
Белорусский государственный университет
информатики и радиоэлектроники

УДК 620.3

Борисюк
Алексей Александрович

Стерилизация клеток бактерий с использованием плазмонных наноструктур на
основе серебра и пористого кремния

АВТОРЕФЕРАТ

на соискание степени магистра технических наук
по специальности 1-41 80 03 «Нанотехнологии и наноматериалы»

Научный руководитель
Бондаренко Анна Витальевна
докт. техн. наук, доцент

Минск 2024

ВВЕДЕНИЕ

Тематика стерилизации с использованием плазмонных наноструктур не является чем-то новым, эта область исследований активно развивалась и продолжает развиваться до сих пор, однако области применения плазмонных наноструктур все еще остаются довольно узкими, особенно в области медицины, это связано с 2 основными причинами: 1) механизм стерилизации (инактивации) является в большинстве случаев термическим, что сразу препятствует использованию таких наноструктур внутри живых организмов (*in vivo*); 2) токсичность плазмонных наноструктур и отсутствие биосовместимости, которое усугубляет токсичный эффект пребывания таких структур внутри живых организмов в том числе человека.

В качестве перспективного решения данной проблемы может выступать изменение механизма стерилизации, а именно, использование плазмонных наноструктур для генерации высокоинтенсивных локальных электрических полей, которые приведут к формированию пор в клетках по механизму электропорации. Такой подход позволяет посмотреть на явление локального поверхностного плазмонного резонанса (ЛППР) с другой стороны, т. к. обычно плазмонный резонанс в наноструктурах воспринимается как эффект значительного увеличения сечения поглощения у наночастиц (НЧ), что можно использовать для нагрева окружающей среды НЧ, однако увеличение сечения поглощения также приводит к усиленному резонансному колебанию электронного газа (плазмонов) с частотой падающего излучения, что в свою очередь приводит к усилению его электрического поля.

Данная магистерская диссертация рассматривает именно этот аспект такого явления как ЛППР, но при этом не обходит стороной рассмотрение фототермического эффекта, т. к. гигантское поглощение наноматериалами в любом случае будет приводить к нагреву.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы магистерской диссертации. На данный момент область исследований, посвященных разработке различных методик стерилизации, становится все более актуальной, т. к., несмотря на все успехи в таких областях, как стерилизация воды, создание антимикробных покрытий, лечение внешних опухолей и т. п., существует острая необходимость в создании подходов, позволяющих расширить применение наноматериалов в сфере *ex vivo* и *in vivo* стерилизации (инактивации). Основная трудность данной задачи заключается в разработке принципа стерилизации, который позволял бы проводить различные операции локально и без вреда близлежащим органам и тканям. В качестве такого принципа предлагается методика стерилизации, основанная на фотогенерируемой электропорации, которая позволяет формировать поры в клеточной мембране, что приводит к гибели клетки по одной из разновидностей некроза.

Цели и задачи исследования. Целью работы является исследование закономерностей взаимодействия плазмонных наноматериалов на основе серебра и пористого кремния с бактериальными клетками при возбуждении электромагнитным излучением оптического диапазона для разработки методики стерилизации, основанной на необратимой электропорации.

Для достижения данной цели будут решены следующие задачи:

- выполнение теоретического анализа электродинамических свойств плазмонных наноструктур на основе серебра и пористого кремния и выбор условий для стерилизации;
- формирование плазмонных наноматериалов на основе серебра и кремния и изучение их структуры, оптических и цитотоксических свойств;
- исследование влияния параметров облучения плазмонных наноматериалов на основе серебра и пористого кремния на жизнеспособность клеток;
- разработка методики стерилизации с применением оптического излучения и плазмонных наноматериалов на основе серебра и пористого кремния.

Объектом исследования являются плазмонные наноструктуры на основе серебра и пористого кремния.

Предметом исследования являются оптические и цитотоксические свойства плазмонных наноматериалов на основе серебра и пористого кремния.

Область исследования: содержание диссертационной работы соответствует образовательному стандарту высшего образования второй ступени (магистратуры) специальности 1-41 80 03 «Нанотехнологии и наноматериалы».

Научная новизна диссертационной работы заключается в использовании наноструктур на основе серебра и пористого кремния (наночастиц и

наноструктурированной пленки серебра) в качестве генераторов высокоинтенсивных электрических полей, которые используются для стерилизации клеток по механизму электропорации.

Положение, выносимое на защиту:

1. Наночастицы серебра, синтезированные модифицированным методом Туркевича, отличающимся от традиционного подхода заменой стабилизирующих цитрат-ионов янтарной кислотой, характеризуются бимодальным распределением по размерам, среднее значение которых составляет 15 и 60 нм, и способствуют усилению напряженности электрического поля, возникающего у их поверхности при возбуждении лазерным излучением с длиной волны 473 нм, в 47 и 18 раз соответственно.

Личный вклад магистранта заключается в проведении всех исследований, описанных в диссертации.

Апробация и внедрение результатов исследования

Результаты исследования были представлены на 59-й научной конференции аспирантов, магистрантов и студентов, г. Минск, апрель 2023 г., БГУИР.

Структура и объем работы. Структура диссертационной работы обусловлена поставленной целью и задачами, а также последовательностью выполнения исследования. Работа состоит из введения, четырех глав, заключения, библиографического списка и приложений. Общий объем диссертации – 99 страниц. Работа содержит 2 таблицы, 55 рисунков и 3 приложения. Библиографический список включает 175 наименований.

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** описаны основные проблемы лимитирующие расширение использования плазмонных наноструктур для стерилизации клеток, а также предложен путь решения этих проблем.

В **общей характеристике работы** сформулированы цели и задачи диссертационной работы, даны сведения об объекте исследования и обоснован его выбор, представлено положение, выносимое на защиту, приведены сведения об апробации результатов диссертационной работы.

В **первой** главе дается теоретический базис по тематике диссертации смешанный с литературным обзором существующих методик стерилизации с применением плазмонных наноструктур, а также обзревается наиболее распространенные методы синтеза плазмонных структур.

Во **второй** главе описываются методы получения плазмонных наноструктур на основе серебра и пористого кремния, а также изучаются электродинамические и фототермические свойства структур.

В **третьей** главе описаны различные методики обработки, культивирования, стерилизации и анализа клеток после облучения. Произведен теоретический расчёт напряженностей электрических полей, генерируемых плазмонными наноструктурами и подтверждена возможность стерилизации в заданных условиях.

В **четвертой** главе описываются особенности влияния параметров облучения бактериальных клеток на степень стерилизации, а также исследуются цитотоксичные свойства полученных плазмонных наноструктур.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам исследований, проведенных в рамках магистерской диссертации, была собрана обобщенная картина о существующих методах стерилизации с использованием плазмонных наноматериалов и оптического излучения. Разработана методика иммерсионного осаждения серебра на ПК для формирования наноструктурированных пленок из этого металла, образованных частицами с преобладающими размерами в диапазонах 200–250 нм и 400–500 нм. Также разработана методика синтеза коллоидных НЧ серебра с органической оболочкой из стабилизирующих агентов. При этом НЧ серебра характеризуются бимодальным распределением по размерам, среди которых доминируют средние значения 15 и 60 нм соответственно.

Проведено моделирование оптических свойств НЧ серебра, включая распределение напряженности электрического поля вблизи их поверхности. Помимо этого, получены значения степеней усиления напряженности электрического поля, генерируемого при облучении в заданных режимах стерилизации, за счет ЛППР, что позволило оценить ее величину. Выяснено, что теоретически рассчитанный максимум усиления достигается на длинах волн 390 и 375 нм для НЧ диаметрами 15 и 60 нм соответственно. Максимальное усиление в 47 раз достигается для НЧ диаметром 15 нм и в 18 раз – для НЧ диаметром 60 нм, при этом степени усиления для использованного в диссертации режима возбуждения ЛППР соответствуют диапазонам 2,5–5,5 раза для НЧ диаметром 15 нм и 3–7,5 раза для НЧ диаметром 60 нм. Для наноструктурированной пленки серебра максимальное усиление достигает 10 раз, а в среднем усиление по поверхности составляет около 2,5 раз.

Моделирование фототермического эффекта в коллоидных НЧ серебра показало, что при облучении в заданном режиме стерилизации температура НЧ и окружающей их среды подымается до 40 °С для НЧ диаметром 60 нм и почти не изменяется (0,3 °С) для НЧ диаметром 15 нм.

Исследование оптических свойств и морфологии НЧ серебра показало, что НЧ имеют близкую к сферической форму, а также путем исследования методами рамановской и ИК-спектроскопии было установлено, что на поверхности НЧ присутствуют как цитрат-ионы, так и сукцинат-ионы, что свидетельствует о конкурирующей стабилизации НЧ серебра. Это опровергает теорию о том, что только янтарная кислота и её производные стабилизируют поверхность НЧ.

Исследование процесса синтеза НЧ модернизированным методом Туркевича указывает на изменение процесса нуклеации НЧ, что приводит к замедлению коалесценции НЧ и повышению стабильности. Механизм данного явления можно связать с влиянием стерического эффекта, а также вязкостью янтарной кислоты.

Путем исследования НЧ серебра с помощью УФ- и видимой спектроскопии удалось получить данные о резонансной частоте для возбуждения ЛППР, которая составила 426 нм. Также было выяснено, что положением пика плазмонного резонанса у НЧ, синтезированных с использованием янтарной кислоты, можно управлять изменяя концентрацию янтарной кислоты при синтезе. Анализ наноструктурированной пленки серебра методами УФ- и видимой спектроскопии показал, что пленка имеет широкий диапазон частот возбуждения ЛППР, начиная от 400 нм и заканчивая 750 нм, что обусловлено большой дисперсией частиц по размерам.

Разработаны 2 установки для проведения стерилизации, которые позволяют генерировать импульсы с частотой до 3 кГц и модулировать ширину импульсов до 300 мкс. Также разработан протокол для селективной окраски мёртвых клеток с использованием Эритрозина Б. Приведено теоретическое обоснование возможности возникновения электропорации, а следовательно, и возможности стерилизации в заданных условиях облучения бактериальных клеток.

По результатам исследования влияния различных параметров и режимов облучения было установлено, что непрерывное облучение не приводит к стерилизации, а всевозможный рост числа мёртвых клеток связан с термическим механизмом некроза. Это было подтверждено экспериментально. Также выяснено, что наибольшее влияние на степень стерилизации оказывают параметры ширины импульса и в большей степени частота импульсов. Повышение частоты импульсов с 500 Гц до 3 кГц приводит к увеличению процента мёртвых клеток с 3 до 12 %. Данная особенность может быть связана с ускорением поляризации клетки и быстрыми циклами зарядки/разрядки клеточной мембраны, либо также связана с выделением джоулева тепла, что приводит к термическому некрозу.

Исследование цитотоксичности полученных плазмонных наноструктур указывает на хорошую биосовместимость и низкую цитотоксичность НЧ серебра с органической оболочкой, что было подтверждено 2 методами (прямого контакта и диско-диффузионный метод). В свою очередь наноструктурированная пленка серебра показала отсутствие цитотоксичного воздействия на бактериальные клетки.

Подводя итоги, стоит отметить, что полученные результаты оптимистичны и свидетельствуют возможности реализации поставленной цели – полной стерилизации. Для этого необходимо провести дополнительные исследования с оптимальными условиями, соответствующими найденным максимумам усиления электрического поля как для НЧ серебра, так и для наноструктурированной пленки. Что касается работы с клетками, то здесь необходимо расширение методов анализа и изучения изменений, происходящих в клетке как после, так и во время стерилизации, для того чтобы можно было понять по какому механизму происходит данный процесс стерилизации.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. Girel, K. Atomic layer deposition of hafnium oxide on porous silicon to form a template for athermal SERS-active substrates / K. Girel, A. Burko, S. Zavatski, A. Barysiuk, K. Litvinova, E. Eganova, [et al.] // Applied Physics A: Materials Science and Processing. – 2023. – Vol. 129 Iss. 4. – P. 1–9.
2. Girel, K. Correlation of surface potential and SERS-activity of Ag particles formed by electroless deposition on Si-based substrate / K. Girel, A. Burko, A. Barysiuk, S. Dubkov, D. Gromov, H. Bandarenka // Current Applied Physics. – 2023. – Vol. 49. – P. 18–24.