

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
_____ Т.Г. Волова

«___» _____ 2022 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Оценка эффективности магнитных наноконплексов в качестве
систем контролируемой доставки антибиотиков

06.04.01 Биология

06.04.01.01 Микробиология и биотехнология

| | | | |
|----------------------|---------------|------------------------------|------------------------|
| Научный руководитель | _____ | <u>к. б. н., доцент</u> | <u>Н. О. Жила</u> |
| | подпись, дата | должность, ученая степень | инициалы, фамилия |
| Выпускник | _____ | | <u>М. В. Лошкарева</u> |
| | подпись, дата | | инициалы, фамилия |
| Рецензент | _____ | <u>к. б. н., науч. сотр.</u> | <u>Е.Д. Николаева</u> |
| | подпись, дата | | инициалы, фамилия |

Красноярск 2022

РЕФЕРАТ

Магистерская диссертация по теме «Оценка эффективности магнитных наноконплексов в качестве систем контролируемой доставки антибиотиков» содержит 80 страниц текстового документа, 51 иллюстрацию, 5 таблиц, 76 использованных источников.

МАГНИТНЫЕ НАНОКОМПЛЕКСЫ, НАНОЧАСТИЦЫ, АНТИБИОТИКИ, СИСТЕМЫ КОНТРОЛИРУЕМОЙ ДОСТАВКИ АНТИБИОТИКОВ, БАКТЕРИАЛЬНЫЕ БИОПЛЕНКИ.

Целью данной работы являлась оценка эффективности магнитных наночастиц в качестве антибактериальных препаратов.

В результате проведенных исследований была получена серия наночастиц на основе железа, с покрытием полисахаридами хитозан и арабиногалактан, и нагрузкой антибиотиком Амоксиклав в трех концентрациях (3, 10, 20 мкг/мл). Проведена оценка антибактериальной активности полученных наночастиц. Показано, что частицы на основе Fe нетоксичны для бактерий, абсорбция антибактериального препарата на полученных наночастицах подавляла рост бактерий, но не значительно. Разработаны магнитные наночастицы, легированные Zn, Co и Ni, изучено антибактериальное действие легированных магнитных наночастиц в сочетании с переменным магнитным полем, в жидких и на твердых питательных средах. Показано, что воздействие магнитных наночастиц, в том числе легированных металлами, в магнитном поле снижало формирование биопленки.

СОДЕРЖАНИЕ

| | |
|---|----|
| РЕФЕРАТ | 2 |
| ВВЕДЕНИЕ | 5 |
| 1 Обзор литературы..... | 8 |
| 1.1 Биопленки как модель для исследования возможностей медицинского применения магнитных наночастиц | 8 |
| 1.2 Возможности применения наночастиц | 10 |
| 1.3 Применение наночастиц для борьбы с биопленками | 15 |
| 1.4 Возможности биомедицинского применения ферригидрита.. | 19 |
| 1.5 Способы получения и структурные особенности различных магнитных наночастиц | 23 |
| 1.6 Биологический метод получения и структура наночастиц ферригидрита..... | 25 |
| 1.7 Структура и свойства наночастиц ферригидрита (полученные химическим способом) | 32 |
| 1.8 Отличие биогенных наночастиц от синтетических..... | 32 |
| 1.9 Методы обнаружения наночастиц ферригидрита | 33 |
| 2 Материалы и методы..... | 35 |
| 2.1 Получение частиц | 35 |
| 2.2 Электронная микроскопия | 36 |
| 2.3 Оценка антибактериальной активности. | 36 |
| 2.4 Методика по измерению плотности биопленок | 37 |
| 2.5 Методика оценки антибактериальной активности с помощью проточного цитофлуориметра CytoFlex S (Beckman) | 38 |
| 2.6 Статистический анализ..... | 39 |
| 3 Результаты..... | 40 |
| 3.1 Характеристика наночастиц | 40 |

| | | |
|-----|--|----|
| 3.2 | Оценка антибактериальной активности наночастиц по подавлению роста бактерий на твердой питательной среде | 47 |
| 3.3 | Оценка антибактериальной активности по формированию бактериальной пленки | 54 |
| 4 | ЗАКЛЮЧЕНИЕ | 71 |
| | СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ | 72 |

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время существует проблема возникновения резистентности микроорганизмов к известным антибиотикам, что привело к развитию двух направлений фармакологии: поиску новых антибиотиков и поиску новых способов доставки препаратов в клетки. Это связано с тем, что бактерии чаще существуют в виде биопленок – гетерогенных сообществ микроорганизмов, окружённых внеклеточным матриксом. Биопленка имеет систему канальцев и везикул, которые обеспечивают поступление к микроорганизмам питательных веществ, газообмен, выведение метаболитов, защиту от высыхания, УФ излучения, антибактериальных препаратов, везикулы содержат гидролитические ферменты для утилизации погибших микробных клеток, которые затем также используются как питательный субстрат [1].

Резистентность биопленок к антибиотикам объясняют несколькими факторами:

- мембрана на поверхности биопленки защищает от проникновения антибиотиков к клеткам микроорганизмов;
- ферменты, входящие в состав внеклеточного матрикса, инактивируют антибиотики;
- антибиотики в биопленках менее биологически доступны по сравнению с суспензионными бактериями (на которых обычно проверяют антибактериальное действие препаратов), за время проникновения антибиотиков внутрь биопленки, клетки успевают выработать резистентность;
- поскольку антибиотики обычно направлены на активно делящиеся клетки, на микроорганизмы, которые находятся в неактивном состоянии, препараты не действуют.

Различные биопленки на поверхности медицинского оборудования, приводят к осложнениям, развитию сепсиса, формированию хронических

ран. Хронические раны могут сопутствовать таким нарушениям в организме, как нехватка питательных веществ из-за недоедания, нарушений метаболизма, диабет, ослабленный иммунитет и возрастные изменения.

Предполагается, что использование наночастиц в качестве способа доставки антибиотиков поможет увеличить проницаемость и доступность препарата. Переход материалов на наноразмерный масштаб обуславливает появление новых свойств. Например, для таких материалов могут быть характерны новые оптические, электрические, температурные свойства и т.д. По мнению многих авторов, использование нанотехнологий в медицине может коренным образом поменять существующие подходы к диагностике и лечению различных заболеваний [2-4].

В частности, существуют данные об исследованиях возможного применения наночастиц для лечения интоксикаций, онкологических заболеваний, заболеваний системы крови и др. [5,6]. При этом предполагается, что в отличие от классических лекарственных препаратов, наночастицы могут быть менее токсичными и в ряде случаев более эффективными.

Так, например, предполагается, что наночастицы могут применяться в качестве средства для адресной или управляемой, с помощью внешнего магнитного поля, доставки лекарственных субстанций к очагу патологии с контролируемым высвобождением действующего вещества. Это обеспечит минимизацию побочных эффектов и повышение концентрации действующего вещества непосредственно в очаге патологии [3, 7]. Они также могут использоваться и в качестве самостоятельных терапевтических агентов. Например, магнитные наночастицы на основе ферригидрита в сочетании с внешним магнитным полем могут использоваться для локального нагрева определенных тканей, что может быть использовано для борьбы с новообразованиями [8].

В настоящее время известны различные способы получения магнитных наночастиц, что определяет их физико-химические особенности и характер

взаимодействия с организмом. В частности, существует способ получения биогенных магнитных наночастиц в результате культивирования определенных бактерий. Также существуют различные варианты их химического синтеза.

Исследование возможностей биомедицинского применения нанообъектов предполагает обязательную оценку их токсикологических свойств, в частности, их распределение по организму и их воздействие на организм.

Целью работы была оценка эффективности магнитных наночастиц в качестве антибактериальных препаратов.

Были поставлены следующие задачи:

1. Получить магнитные наночастицы химического ферригидрита и магнетита с полисахаридным покрытием, в том числе, легированные никелем, кобальтом и цинком;
2. Получить магнитные наночастицы бактериального ферригидрита и магнетита с полисахаридным покрытием;
3. Провести иммобилизацию антибактериальных препаратов (амоксицилина и амоксиклава);
4. Изучить структуру магнитных наночастиц;
5. Изучить антибактериальную активность комплексов на примере грамположительных и грамотрицательных бактерий (*Bacillus pumilus*, *Arthrobacter polychromogenes*, *Escherichia coli*) различными методами.

1 Обзор литературы

1.1 Биопленки как модель для исследования возможностей медицинского применения магнитных наночастиц

Микробные биопленки представляют собой сообщества агрегированных микробных клеток, встроенных в самопродуцирующийся матрикс внеклеточных полимерных веществ. Такие микробные биопленки позволяют бактериям противостоять неблагоприятным факторам окружающей среды, таким как высокоинтенсивное ультрафиолетовое (УФ) излучение, высокая или низкая температура, высокая щелочность, высокая кислотность, высокая соленость, высокое давление, воздействие антибиотиков и т. д. Так раньше считалось, что при таких условиях жизнь невозможна, но как выяснилось, такие среды содержат большое количество микроорганизмов. Окаменелые биопленки были обнаружены в глубоководном вулканогенном массивном сульфидном месторождении возрастом 3,2 миллиарда лет. Формирование биопленки – это сложный и динамичный процесс, в котором организованные сообщества микроорганизмов заключены в матрицу экзоклеточного полисахаридного матрикса ЭПМ (или биополимерный матрикс – БПМ), которая объединяет микробные клетки вместе. ЭПМ в основном состоит из полисахаридов, белков, липидов и нуклеиновых кислот, которая образует полярную смесь, которая вносит свой вклад в общий каркас и трехмерную структуру биопленки. В экстремальных условиях микроорганизмы регулируют экспрессию ряда генов образующих биопленку посредством QS (Quorum Sensing (QS) – это особый тип регуляции экспрессии генов бактерий, зависящей от плотности их популяции) нуклеотидной второй мессенджерной сигнализации чтобы наделить микроорганизмы способностью становиться устойчивыми к различным экстремальным средам, таким как ультрафиолетовое излучение, экстремальная температура и pH, высокая соленость, высокое давление, плохие питательные вещества, антибиотики и

т. д.. Защита микробными биопленками, по-видимому, также играет существенную роль в производстве специальных ферментных препаратов для фармацевтической промышленности, пищевой промышленности, сельскохозяйственного производства, охраны окружающей среды, использование энергии и других областях промышленности, а также научных исследованиях. [9].

Исследования инфекций, связанных с биопленкой, приобретают все большее значение благодаря их участию в большинстве клинических инфекций. Биопленка рассматривается как универсальный механизм выживания, используемый как патогенными, так и непатогенными бактериями. Биопленки представляют собой гетерогенную структуру поверхностно-ассоциированных микроорганизмов, инкапсулированных в самопродуцирующуюся полимерную матрицу, которая состоит из полисахарида, белка и ДНК. Это биопленка действует как физический барьер против лекарств и обеспечивает защитную пленку для выживания микроорганизмов. Биопленки представляют большую биологическую опасность для человека. Так, например, бактерии клебсиелла и псевдомонады способны образовывать биопленки на мочевых катетерах, когда повышается щелочность мочи [10].

Эффективность действия лекарственных веществ при наличии на раневой поверхности биопленок уменьшается вследствие нескольких факторов:

- мембрана на поверхности биопленки защищает от проникновения антибиотиков к клеткам микроорганизмов;
- ферменты, входящие в состав внеклеточного матрикса, инактивируют антибиотики;
- антибиотики в биопленках менее биологически доступны по сравнению с их применением в отношении бактерий, находящихся в суспензии (на которых обычно проверяют антибактериальное действие препаратов);

- за время, требующееся для проникновения антибиотиков внутрь биопленки, клетки успевают выработать резистентность;

- часть бактериальных клеток из-за особенностей биопленки находятся в статусе замедленного метаболизма, а поскольку антибиотики обычно направлены на активно делящиеся клетки, на неактивные клетки препараты не действуют. Биопленки являются сложными функционально адаптированными сообществами одного или нескольких видов микроорганизмов, окруженных синтезируемым ими внеклеточным матриксом. В бактериальные сообщества биопленок могут входить патогенные, условно-патогенные и непатогенные бактерии и грибы. Матрикс составляет до 95% от массы биопленок и состоит из белков, полисахаридов, липидов, бактериальных нуклеиновых кислот, и покрыт мембраной, сходной по строению с плазматической мембраной бактерий. Биопленка имеет систему канальцев и везикул, которые обеспечивают поступление к микроорганизмам питательных веществ, газообмен, выведение метаболитов, защиту от высыхания, ультрафиолета и т.д. [11].

1.2 Возможности применения наночастиц

Наночастицы обладают уникальными свойствами, благодаря которым в последнее время находят все большее применение в различных областях биомедицины. Так, их предлагают использовать в качестве носителей для управляемой или целевой доставки лекарственных субстанций к патологическому очагу в организме пациента, а также при создании различных систем диагностики *in vitro*, и в качестве контрастирующих агентов для томографии [12-14].

Наночастицы могут иметь различное химическое строение, отличаться друг от друга своими размерами, они могут быть разной формы и обладать различными свойствами. Наночастицы – это сложные многокомпонентные структуры, иногда они многослойны, и каждый слой может обладать

разными химико-физическими свойствами. В биологии и медицине используется широкий диапазон наночастиц. Так, например, липосомы – наносферы, заключенные в липидную оболочку. В отличие от других наночастиц они имеют большие размеры. Лекарство в таких наночастицах может помещаться на липидной оболочке, либо внутри частицы [2].

Полимерные наночастицы получают из биосовместимых или биоинертных полимеров природного и синтетического происхождения. Полимерные частицы могут варьировать в форме и размерах, например, полимерные мицеллы, имеют размер примерно 10 нм [15].

Подвид полимерных частиц – полисахаридные наночастицы, также широко используют для доставки лекарств [16].

Керамические наночастицы имеют пористую структуру, в основу которой входит алюминий, титан и кремний. Эти наночастицы чаще используют при лечении опухолевых заболеваний [17].

Для диагностирования заболеваний магнитно-резонансными методами используют наночастицы оксида железа, которые покрываются специальной защитной пленкой. Эти наночастицы могут обладать парамагнитными свойствами [18].

Также существуют композитные наночастицы, они имеют в своем строении оболочку и ядро. Эти частицы применяют для доставки лекарств, но для того, чтобы оболочка раскрылась, нужно воздействие температуры или излучение [19].

Фуллерены представляют собой одну из аллотропных модификаций углерода, замкнутую сферу и связываются шести- или пятиугольниками. Самый маленький фуллерен имеет 60 атомов углерода и размер всего 1 нм. Другие фуллерены достигают размеров чуть больше 10 нм. Фуллерены так же считаются хорошим носителем для лекарств и радиоактивных меток [21].

Углеродные нанотрубки – это наночастицы свернутые в форме цилиндрической плоскости и выложенные правильными шестиугольниками. Они могут быть однослойными или многослойными, а в длину могут

достигать 1000 нм. Этот материал обладает высокой электропроводностью и прочностью. Так углеродные нанотрубки могут являться носителями лекарств [22].

Флуоресцентными свойствами обладают квантовые наночастицы. Они имеют размеры около 100 нм. Эти частицы предполагается использовать в диагностике опухолевых заболеваний, а также для контроля активности клеток и тканей [2].

Металлические наночастицы могут быть использованы как носители лекарств, так и самостоятельно в качестве лекарственных препаратов. Например, давно известны антибактериальные свойства серебра. В работе [20] (Sangiliyandi Gurunathan) наночастицы серебра размером 10-30 нм уменьшали популяцию бактерий кожных ран. [20].

Тестирования показали, что серебро ингибировало колонию золотистого стафилококка. В отличие от других частиц, частицы серебра маловосприимчивы к окислительной коррозии и агрегации. Токсичность для бактерий вызвана связыванием ионов Ag^+ . Предполагают, что наночастицы серебра связываются с сульфгидрильными группами. Ионы Ag^+ , катализируют реакции, которые приводят к развитию окислительного стресса в тканях. [23]

В другом исследовании проводили иммобилизацию инсерционного пептида, который был покрыт аminosиланом и магнитными наночастицами с диаметром 10 и 20 нм. Эти материалы не токсичны и могут послужить наноносителями для таргетной доставки лекарственных веществ к опухолевым клеткам. Конъюгация пептидов на поверхности была более эффективна, так как частицы обладали большой площадью. Благодаря тому, что кремнезем имеет пористое строение, предполагают, что в будущем такой нанокompозит смогут нагружать лекарствами. Предположительно, лечение будет поступать адресно на места с злокачественными новообразованиями. [24]

Для того, чтобы визуализировать железные наночастицы, они должны накопиться в нужной клетке в определенном объеме. Такие характеристики, как структура и поверхность частицы эффективнее обнаруживать на ЯМР-томографе. [25]

В настоящее время магнитные наночастицы играют важную роль контрастного агента в МРТ. Shih-Hung Huang выяснили, что магнитные частицы менее склонны к агрегации и не вызывают тромбоз кровеносных сосудов. Модификация поверхности наночастиц не дает им агрегироваться. Чистые металлы очень токсичны и чувствительны к окислению, следовательно, без дополнительной обработки поверхности, такие чистые металлические наночастицы не могут применяться для биомедицинских целей. Железооксидные магнитные НЧ имеют несколько кристаллических полиморфов, среди которых α -Fe₂O₃ (маггемит) и Fe₃O₄ (магнетит) они являются подходящими кандидатами для различных биомедицинских применений. Так же магнитные НЧ покрывают полимерами, которые затем образуют ковалентные связи между полимером.

Бао и соавт. (2007) изготовили бифункциональные наночастицы Au – Fe₃O₄, с помощью которых им удалось разделить полученные белки-мишени (аргининкиназа * 43 кДа).

Huang et al. использовали Fe₃O₄ с липазой для её хранения. Выяснилось что липаза, сохранялась лучше за счет поверхности на наночастице.

Магнитные НЧ можно использовать для адсорбции загрязняющих веществ (например, ионов тяжелых металлов и красителей) из водного раствора. [67].

Lina Kafrouni с др. изучала синтез суперпарамагнитных наночастиц (SPMNPs) и использование этих частиц в магнитной терапии гипертермии. Таким образом, они продемонстрировали успехи в лечении опухоли. Когда происходит вращение магнитного момента и трение, возникающее при колебаниях частиц, выделяется тепло. [68].

Mohamed M. Fathy и другие использовали в своем эксперименте диоксид кремния, для того чтобы повысить эффективность поглощения лучевой терапией опухолевые ткани. В этой работе рассматривали наночастицы оксида железа (IO-MNP) и магнитные частицы оксида железа, покрытых диоксидом кремния (SIOMNP), их использовали против клеток рака молочной железы MCF7. Клетки MCF7 обрабатывали различной дозой облучения электронным пучком в дозах 0, 0,5, 1, 2, 4 Гр. Наночастицы оксида железа показывают свою терапевтическую эффективность. Наночастицы оксида железа использовались в качестве терапевтических агентов из-за двух основных интересных свойств: суперпарамагнетизма (который позволит облучить целевой орган с помощью внешней магнитной силы) и хорошую биосовместимость. Исследование Mohamed показало, что в результате клетки, обработанные облучением только в дозах 0,5, 1, 2 и 4 Гр, имеют хорошую жизнеспособность, которая составляет 80%, 60%, 50% и 47%. Хотя с другой стороны, клетки, обработанные только радиацией без наночастиц, оказались более жизнеспособными, чем клетки с железными наночастицами. Они рассмотрели повреждение ДНК с помощью флуоресценции и отметили, что с увеличением концентрации наночастиц и дозы облучения все больше увеличивался повреждающий эффект [69].

В своей работе Santosh L. Gawali и др. изучали магнитные наноносители, покрытые аскорбиновой кислотой, которые применялись для доставки противоракового препарата доксорубицина гидрохлорида (DOX) в опухолевые клетки. Магнитные наноносители, покрытые аскорбиновой кислотой, демонстрируют высокую коллоидную стабильность в водных и клеточных средах и обладают хорошей чувствительностью к магнитному полю, а так же частицы устойчивы к белкам. Исследователи думают, что эти наночастицы могут быть полезным объектом в рассмотрении лекарства для опухоли головного мозга в будущем. С помощью просвечивающего электронного микроскопа подтвердили изменение морфологии магнитной наночастицы до и после покрытия аскорбиновой кислотой. Показано, что

молекулы лекарственного средства высвобождались медленно в течение 70 ч [70].

1.3 Применение наночастиц для борьбы с биопленками

Многие используемые в настоящее время антибиотики имеют ряд проблем, таких, как токсичность, короткий период полураспада и повышенная восприимчивость к бактериальной резистентности. Металлические наночастицы и наночастицы из оксидов металлов также могут обладать антибактериальными свойствами, при этом механизмы их действия отличаются от антибиотиков и не вызывают резистентности [27].

Исследованы различные металлы, включая медь, цинк, золото и др., и их комбинации для борьбы с микроорганизмами, в качестве самостоятельных антибактериальных препаратов, и в сочетании с антибиотиками [28,29].

Например, давно известны антибактериальные свойства серебра. В статье было показано, что комплекс хитозан-серебро дает высокую антибактериальную активность. Наноконпозиты CS-AgNPs (хитозан – серебро) сферической формы с различными антибиотиками были получены со средними диапазонами размеров 80-120 нм. Индекс биосовместимости (BI) показал, что конъюгированные с антибиотиками CS-AgNPs обладают низкой токсичностью. Биохимический анализ и гистопатологические исследования подтвердили низкую токсичность при незначительной гепатотоксичности при более высоких дозах. После приема внутрь наблюдалось обширное распределение иона Ag в селезенке и печени [30].

Наночастицы металлов и оксидов металлов могут проникать в водную среду, что приводит к загрязнению воды в сточных водах. В данной работе сравнивали эффективность биопленки с активным илом, из сточных вод пытались удалить наночастицы металлов и оксидов металлов. Было показано, что биопленки методом абсорбции эффективнее задерживают в себе частицы металлов, чем активный ил [31].

В работе Said M. Daboor, исследователи рассматривали применение комбинированной альгинатной лиазы и антибиотиков для лечения инфекций, связанных с биопленкой *P. aeruginosa*. Синегнойная палочка является условно-патогенной бактерией, она может приводить к опасным осложнениям при снижении защитных функций организма, сопровождающем, например, муковисцидоз. Ферменты лиазы обладают биопленочно-дисперсионными свойствами и проявляют синергизм с антибиотиками при котором может произойти разрушение биопленок *P. aeruginosa*. Однако в других работах альгинатные лиазы не ингибировали биопленку мукоидного CF-изолята *P. aeruginosa*. Предполагают, что альгинатная лиаза зависит от ее каталитической активности изолята. В будущем ферментативное разрушение экзополисахаридов в биопленках *P. aeruginosa* представляет собой перспективное терапевтическое средство для лечения биопленочных инфекций. Обработка ципрофлоксацином или тобрамицином не приводила к значительному уменьшению биомассы биопленки и даже усиливали эффект роста у *P. aeruginosa* [32]. Было показано, что хиолин НТ61¹ проявляет хорошую антимикробную активность. Устойчивые к антимикробным препаратам биопленки золотистого стафилококка обычно ассоциируются с хроническими инфекциями, особенно на коже и мягких тканях.

Исследования инфекций, связанных с биопленкой, приобретают все большее значение благодаря их участию в большинстве клинических инфекций. Биопленка, рассматриваемая как универсальный механизм выживания, используемый как патогенными, так и непатогенными бактериями. Биопленки представляют собой гетерогенную структуру поверхностно-ассоциированных микроорганизмов, инкапсулированных в самопродуцирующуюся полимерную матрицу которая, состоит из полисахарида, белка и ДНК. Это биопленка действует как физический барьер

¹ Органическое соединение гетероциклического ряда

против лекарств и обеспечивает защитную пленку для выживания микроорганизмов. Биопленки являются опасными биологическим веществом для человека. Так, например, бактерии клебсиелла и псевдомонады способны образовывать биопленки на мочевых катетерах, когда повышается щелочность мочи [10].

Для уменьшения образования биопленок золотистого стафилококка были разработаны композитные комплексы наночастиц кремнезема с ампициллином и 1,3-пропансультоном. Бактерии с множественной лекарственной устойчивостью являются одной из причин смертности пациентов с травматическими поражениями. Данный нанокompозит имеет хорошую абсорбционную поверхность и очень перспективен в качестве носителя антибиотиков для задач таргетной терапии. [33].

Все более широкое применение наночастиц металлов и оксидов металлов привело к увеличению их концентрации в водной среде. Показано, что биоактивный ил частично сорбирует и дезактивирует металлические наночастицы, но не обеспечивает их полного удаления, что приводит к долгосрочному воздействию наночастиц на водные биоценозы, поэтому одна из задач разработки и исследований наночастиц – минимизировать высвобождение и воздействие наночастиц в окружающей среде. [31].

Наночастицы сульфида железа, стабилизированные карбоксиметилцеллюлозой (СМС-FeS)² продемонстрировали отличную сорбцию/иммобилизацию ртути в воде и почве. Полученные наночастицы обеспечивали необычайно высокую сорбционную способность ртути и высокую скорость сорбции. Рентгенография показала, что образовались комплексы магнита и ртути. Такой комплекс, предположительно, не будет токсичен для живого организма. Таким образом, соединение железо-медь может помочь при очистке подземных вод, загрязненных ртутью. Даже

² Карбоксиметилцеллюлоза – железосера

спустя 6 месяцев этот комплекс не терял своих свойств и сорбционную активность. [45]

Магнитные наночастицы рассматриваются для лечения инфекционных заболеваний. Магнитные наночастицы могут быть либо загружены антимикробным веществом для использования в качестве средств доставки, либо модифицированы для того, чтобы они приобрели собственные антимикробные свойства. Магнитные наночастицы также могут быть использованы на определенных тканях, чтобы уничтожить инфекционные микроорганизмы. Для того, чтобы частица прошла через биопленку, используют магнитное поле. Оно может создавать искусственные каналы для усиленного транспорта антибиотиков. Более 80% всех бактериальных инфекций человека вызываются бактериями, растущими в биопленочном режиме роста. Биопленка может быть устойчива к лекарственным препаратам. По прогнозам исследователей к 2050 году будут появляться устойчивые штаммы микроорганизмов. Исследователи работают над разработкой новых антимикробных препаратов, они придумывают новые стратегии борьбы с инфекциями, основанные на нанотехнологиях, такие методы в будущем могут стать многообещающими. Многие новые наноантимикробные препараты производят активные формы кислорода, против которых большинство бактериальных штаммов и видов до сих пор не имеют защиты. Фототермические наночастицы, которые могут локально генерировать большое количество тепла, убивающее инфекционных обитателей биопленки, представляет собой новый класс наноантимикробных препаратов с совершенно новым, антимикробным рабочим механизмом. Магнитно-таргетные наночастицы с антимикробной модификацией или без нее также являются новыми в области лечения бактериальных инфекций. Магнитные наночастицы обладают тремя важными свойствами, которые делают их пригодными в качестве антимикробного средства: это их способность генерировать активные формы кислорода, которые могут вызвать повреждение клеточной стенки бактерий, их фототермические

свойства, благодаря которым они могут локально генерировать тепло для уничтожения инфекционных бактерий, их способность механически разрушать ЭПС-матрицу биопленки. [26].

Таким образом, исследования по созданию безопасных наночастиц для разных задач остаются актуальными.

1.4 Возможности биомедицинского применения ферригидрита

Наночастицы на основе железа благодаря специфическим магнитным свойствам представляют большой интерес для биомедицины. Так, Pushkar Kulkarni et al. разработали новые магнитные наночастицы, которые содержат иринотекан, используемый для лечения злокачественных новообразований. Эти частицы могут быть использованы как способ удержания лекарственного средства в легких для максимальной эффективности с использованием внешнего магнита. Разработанное средство оказалось высоко эффективным и экономически выгодным благодаря дешевому синтезу. Исследование проводилось как *in vivo*, так и *in vitro* [7].

В работе Ina Rosenberger et al. было показано, что оксид железа обладает противовоспалительными свойствами, наночастицы были не токсичны для животных. Детекцию тканей проводили с помощью магнитно-резонансной томографии (МРТ). В последнем десятилетии МРТ, а также позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ) стали важным этапом в медицине. Эти железные наночастицы контрастируют опухоль в печени. Железные наночастицы совмещали с маггемитом ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Материал для этих исследований выбирали исходя из того, что он должен быть биodeградируемым, нетоксичным и иметь функциональные группы на поверхности для активных процессов. Количество железа в капсулах определяли методом атомно-абсорбционной спектроскопии. Железо определяли количественно из супернатата. При вскрытии не наблюдалось значительных особых изменений, результаты были сходны с контрольными

животными. Наночастицы определяли в печени, селезенки, почках, легких и сердце. Результаты показали, что исследованные частицы не токсичны и обладают противовоспалительными свойствами. Также отбирались маркеры для адресной доставки. Предполагается, что эти магнитные наночастицы в будущем могут быть использованы в лечении онкологических заболеваний [6].

В другой работе К. G. Dobretsov et al. изучали воздействие наночастиц на определенной области организма. Суспензию магнитных наночастиц применяли в хирургической операции носовой кости и хрящевой ткани. Также, создавалось магнитное поле для магнитотерапии. Результаты показали, что магнитные наночастицы, помещенные в магнитное поле градиента, могут проникать внутрь хрящевой и костной ткани. Наночастицы вводили эндотрахеально, внутримышечно, подкожно и перорально. В эксперименте на тканях было локальное действие магнитных наночастиц с помощью магнитного поля. Исследования проводилось на хряще и кости. Ткань перегородки носа резецирована у 10 больных. Была проведена успешная операция без признаков воспаления или других нарушений хрящевой и костной ткани. Магнитный порошок добавляли в 1 мл 0,9% раствора NaCl. Без воздействия магнитным полем, наночастицы не проникали в хрящевую ткань, но были расположены на поверхности хряща. При воздействии магнитного поля на наночастицы, они проникали через костные пластинки во все типы тканей. Результаты показывают, что магнитное воздействие на железосодержащие наноматериалы в течение 20 мин приводит к проникновению наночастиц в толщину хрящевой и костной тканей. [34] .

F.J. La'zaro et al. вводили экспериментальным животным декстран и частицы железа, затем отслеживали их в разных промежутках времени. Эксперименты показали, что концентрация наночастиц, содержащихся во вводимом препарате, постепенно снижается в живой ткани. В эксперименте был использован переменный ток как дополнительный инструмент в фармакологическом исследовании железосодержащих препаратов.

Суспензию декстрана, содержащего наночастицы акаганита ($h\text{-FeOOH}$), использовали при лечении дефицита железа анемии железа и вводили перорально. Также дозу препарата железа и декстрана вводили подкожно в области спины. После введения, содержание ферритина в организме было выше, чем у контрольных групп. Внутриклеточное железо было обнаружено в лизосомах. После введения железо по истечению двух дней начинало убывать. Ферритин увеличивался через 7 дней. Железо в значительной степени накапливается в макрофагах соединительной ткани. [5]. Магнитные наночастицы, под воздействием внешнего магнита могут быть использованы в направленном транспорте для доставки лекарственных препаратов, нуклеиновых кислот, биоактивных веществ, а также для иммобилизации антител и сепарации биологических объектов. Более крупные частицы могут быть использованы для доставки лекарственных средств или при биологическом зондировании [35].

Наночастицы используют для гипертермии, то есть под воздействием внешнего магнитного поля происходит разогрев наночастиц, что приводит к локальному нагреву определенных тканей, например, новообразований [8].

Гипертермию можно сочетать с лучевой и химиотерапией, тем самым увеличивая эффективность химиолучевой терапии при минимальных дозах [36].

В одном из исследований были использованы высоко лимфотропные суперпарамагнитные наночастицы. МРТ выявил небольшие узловые метастазы у пациентов с раком простаты, этот метод оказался более эффективным в обнаружении опухоли [37].

Так же, магнитные наночастицы с сшитым оксидом железа в сочетании с ближней инфракрасной областью спектра были использованы для наблюдения во время операций опухоли головного мозга [38].

В работе Пахомовой изучали активные форм кислорода (АФК) клетками печени крысы при воздействии наночастиц ферригидрита. В результате проведенного исследования показано, что наночастицы

биогенного ферригидрита способствуют усилению генерации активных форм кислорода в клетках печени. О генерации АФК в клетках печени судили по параметрам хемилюминесцентной реакции. Введение наночастиц не приводило к изменению тонуса сосудов изолированной печени: перфузионное давление оставалось на уровне контрольных значений, что свидетельствует о нормальной циркуляции жидкости в органе. Добавление биогенного ферригидрита в перфузионный раствор Кребса стимулирует прооксидантную активность в отношении продукции первичных АФК клетками [39].

В другой работе (Хижняк С.В.) было показано, что биогенные частицы ферригидрита оказывают существенное влияние на эффективность протравителей семян зерновых культур. Наночастицы статистически значимо повышают всхожесть семян овса. Наночастицы биогенного ферригидрита существенно стимулируют рост корней при низких концентрациях порядка 1,5 мг/л [40].

В работе Столяра и др. выяснилось, что при ультразвуковой обработке ферригидрита происходит расщепление молекулы воды на свободные радикалы. В результате чего из реакций образуется молекулярный водород (H_2), перекись водорода (H_2O_2), свободные радикалы H , OH , OH_2 , O_2H , сольватированные электроны [41].

В другой работе этих же авторов магнетит исследовали в качестве агента доставки лекарств. Суспензию магнетита с инъекцией вводили в лимфатический узел. В ходе опыта не наблюдалось явного скопления наночастиц в таких органах, как печень, селезенка, почки, сердце и легкие. При этом обнаружено, что наночастицы легко проходят через клеточную мембрану.

В исследовании Yang et al., к магнитными наночастицам прикрепляли активированный уголь для исследования раковых клеток. Эксперимент проводился *in vitro*. Выяснилось, что носитель не оказывал относительно

токсического действия на опухолевые клетки. Уменьшения метастазного лимфатического узла у инъекцированных крыс выявлено не было.

В работе по исследованию наночастиц для гипертермии использовали магнетитовые катионные липосомные наночастицы покрытые декстраном. В последние годы такая методика была предложена в качестве одного из потенциальных методов лечения рака. Разработанные частицы обладают рядом полезных свойств: они обеспечивают нагрев зоны опухоли; способны поглощать больше энергии при воздействии переменного магнитного поля. Также их можно использовать в качестве контрастных агентов при ЯМР-исследованиях. [42].

Таким образом, было показано, что магнитные наночастицы мало токсичны для организма и имеют широкий спектр применения в биомедицине.

1.5 Способы получения и структурные особенности различных магнитных наночастиц

Известны разные способы получения магнитных наночастиц, включая химические, физические и биологические.

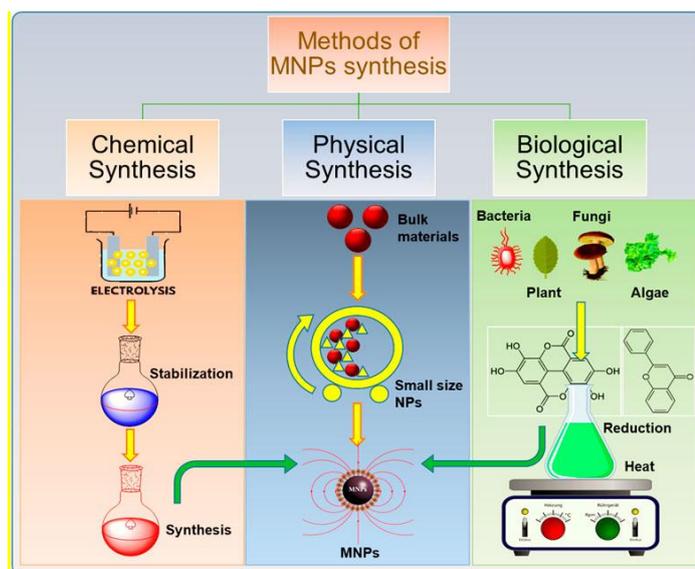


Рисунок 1 – Схема разных способов синтеза магнитных наночастиц.

(<https://doi.org/10.3389/fchem.2021.629054>)

Физические методы включают механический способ – измельчение материала до наноразмерного уровня с помощью шаровой мельницы, лазерное испарение – когда наночастицы образуются за счет конденсации из жидкой или газообразной фазы, метод взрывающейся проволоки. [43].

Химические методы включают химическое соосаждение, гидротермальный синтез, термическое разложение, золь-гель метод и др. Химическое соосаждение считается наиболее дешевым и легкодоступным способом.

Магнетит, полученный методом соосаждения, образует частицы со структурой шпинели и сферической формой. Намагниченность частиц уменьшается с увеличением температуры. Такие частицы могут быть получены варьированием разных параметров, подобранных экспериментально, таких как значение pH, концентрация реагентов и ионов, температура и скорость перемешивания. На качество и свойства наночастиц наиболее сильно влияли обработка ультразвуком и скорость перемешивания. Оптимальный размер и качество частиц были получены при частоте 200 кГц и скорости перемешивания 600 об / мин [44].

В работе Klekotka et al. исследовано получение магнетита химическим методом. Свойства этого материала подходят для биомедицинских целей. Так же на эти частицы можно прикреплять дополнительные оболочки, например, органику или антибиотики. На поверхности магнетита можно увидеть металлический слой с благородными элементами, такими как Ag, Au и Cu. Металлические слои частицы влияют на её магнитные свойства. Если на этот магнетит мы нанесем вещество с более сложной структурой, мы можем изменить сами свойства частицы. [46]

В работе Столяра с соавт. магнитные наночастицы, полученные химическим соосаждением, имели структуру квадратных пластин со средним размером около 25 нм. У этого феррита как и у бактериального ферригидрита есть тетраэдрические и октаэдрические позиции, которые обозначаются как А и В. Это наночастица имеет на своей поверхности гидроксильные и

водородные радикалы. Эти частицы имеют толщину около 5 нм. Так же эти частицы могут быть использованы при гипертермии (разогреве) клеток [60] .

1.6 Биологический метод получения и структура наночастиц ферригидрита

Среди живых организмов, магнитные наночастицы встречаются не только в бактериях, но также в насекомых, водорослях, клетках птиц и млекопитающих [47-52].

Насекомые, рыбы, птицы и дельфины обладают способностью ориентироваться по магнитному полю Земли. Есть предположение, что магнитными рецепторами являются кристаллы магнетита обнаруженные в клетках животных [53,48].

Микроорганизмы, которые принадлежат к роду *Leptothrix*, способны производить наночастицы оксидов железа, такие как ферригидрит или лепидокрокит [54].

Klebsiella oxytoca – это неподвижная факультативно-анаэробная грамотрицательная палочковидная бактерия, входит в семейство энтеробактерий, часто распространена в окружающей среде. Эта бактерия может культивироваться из кожи, слизистых оболочек, ротоглотки и кишечника здоровых людей и животных, а также из различных тканей клинически пораженных людей и животных.

Большинство людей, инфицированных *K. oxytoca*, остаются бессимптомными, она считается оппортунистическим патогеном и в настоящее время признан клинически значимым патогеном, ассоциированным с внутрибольничными инфекциями у госпитализированных пациентов, включая детей и новорожденных. *K. oxytoca* был культивирован у пациентов с сепсисом, бактериемией, септическим артритом, инфекциями мягких тканей, холециститом, инфекциями мочевыводящих путей и совсем недавно - у новорожденных с коликами.

У бактерии *K. oxytoca* полный портрет ее патогенных механизмов отсутствует у людей и животных.

В Красноярском научном центре СО РАН магнитные наночастицы получают в результате культивирования бактерий *Klebsiella oxytoca*, выделенных из сапропеля озера Боровое Красноярского края.

В озере отсутствуют процессы сульфатредукции и есть механизмы денитрификации и железовосстановления. В озере отбирали сапропель и пропускали его через магнитный сепаратор. Далее микроорганизмы помещались на агаризованную среду и выращивались в анаэробных условиях для получения колоний. *Klebsiella oxytoca* выращивалась на питательной среде Lovley следующего состава: (в г/л): NaHCO_3 – 2.5, $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 0.1, KCl - 0.1, NH_4Cl – 1.5, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 0.6, концентрация цитрата Fe^{3+} - 0.5, дрожжевой экстракт - 0.05. Энергетически весомым субстратом для синтеза биомассы *Klebsiella oxytoca* является цитрат калия, а для накопления ферригидрита – цитрат железа. [53-57].

Биомасса бактерий отделялась на ультразвуковом дезинтеграторе для того, чтобы выделить магнитные частицы. При помощи самарий-кобальтового магнита частицы удобно собирать. Для того чтобы частицы не превращались в бурый осадок в раствор добавляли ингибитор протеаз, иначе частицы не реагировали бы на магнитное поле. Наночастицы сохраняли свои магнитные свойства и внешний вид благодаря добавлению ингибитора. Это означает, что частицы имеют на своей поверхности белковую оболочку. Наличие такой органической оболочки говорит о внутриклеточном происхождении магнитных частиц. На рисунке 2 (а) можно увидеть снимок бактерии, которая была выращена в культуре в течение 15 дней. На рисунке 1 (б) представлена картина электронной дифракции кристаллических образований [58].

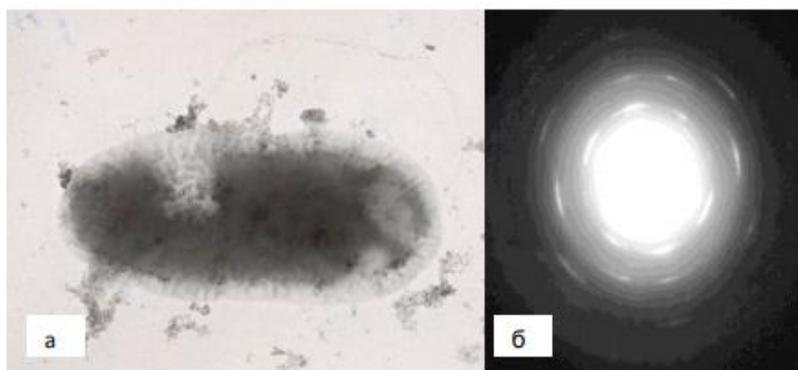


Рисунок 2 – а – Снимок бактерии культуры, выращенной в течение 15 дней, б - Картина микродифракции кристаллических образований, находящихся внутри бактериальной клетки

Так получилось, что бактерии *Klebsiella oxytoca* в процессе своей жизнедеятельности синтезируют наночастицы минерала ферригидрита $5\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$. Ферригидрит есть в тканях человека и животных, там он входит в состав ферритина. Ферритин – это цитозольный комплекс, представляющий собой капсулу с диаметром около 12 нм, он состоит из 24 полипептидных единиц белка, и называется апоферритином. Внутри апоферритиновой капсулы находится наночастица гидроксида железа. Ферритин имеет минеральное ядро, которое имеет выраженную кристаллическую структуру. Ядро ферритина обладает антиферромагнитным спиновым упорядочением атомов трехвалентного железа [7, 6]. Ферригидрит относится к веществам антиферромагнетикам. Из-за малого размера частиц магнитные моменты ионов Fe^{3+} , находящиеся на поверхности частицы, оказываются некомпенсированными, и формируют “паразитный” интегральный магнитный момент отдельной частицы. Суспензию наночастиц осаждали на металлической подложке и затем высушивали. Далее на полученные образцы напыляли вольфрам с использованием магнетронной системы подготовки подложек «МАГ-2000-ВУ», эта система включает вакуумный универсальный пост ВУП-4. Такая структура наночастиц была изучена с помощью лазерно-зондового сканирующего мультимикроскопа

СММ-2000 (ОАО «Завод ПРОТОН-МИЭТ) в режиме, как атомно-силовой микроскопии, так и сканирующей туннельной микроскопии. На рисунке 3а представлено СТМ-изображение наночастиц, осажденных на подложку из суспензии, а на рисунке 3б приведена соответствующая кривая морфологического анализа [41,59,60-62].

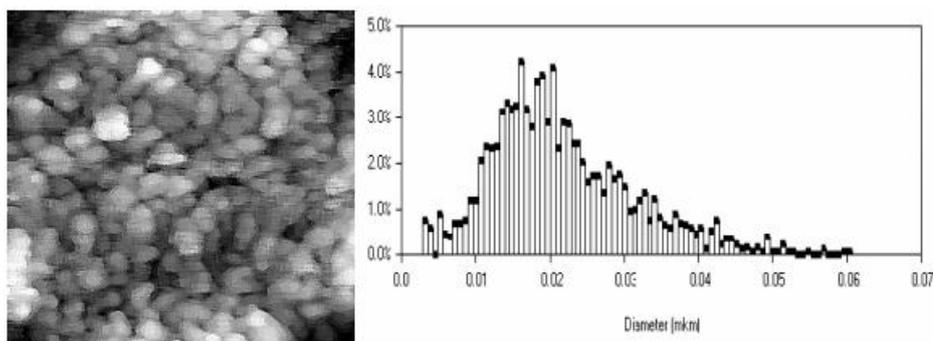


Рисунок 3 – а – СТМ-изображение наночастиц, б – кривая распределения наночастиц по размерам

Две решетки окисей и гидроокисей формируются с помощью плотной упаковки анионов - ОН-групп и кислородов. Существует два типа упаковок – гексагональной и кубической формы. В ферригидрите имеются два типа анионных упаковок. Кубическая упаковка состоит из двухслойного железа Fe1 – у которой, два соседних слоя октаэдров заняты железом. У гексагональной упаковки формируется однослойное железо Fe2 у которой, один слой состоит из октаэдров занятых железом, а второй слой состоит из пустых октаэдров. Чередование кубических и гексагональных слоев может быть случайное (это может зависеть от условий синтеза), так же это влияет на чередование позиций Fe1 и Fe2. У стандартного ферригидрита позиции Fe1 и Fe2 заселены соотношением 2:1. Это означает, что на одну кубическую упаковку приходится один слой гексагональной упаковки анионов. На рисунке 4 стандартный ферригидрит должен иметь анионную упаковку АВАС. Но если химический сдвиг больше величины, то это говорит о том, что ферригидрит пересыщен водой.

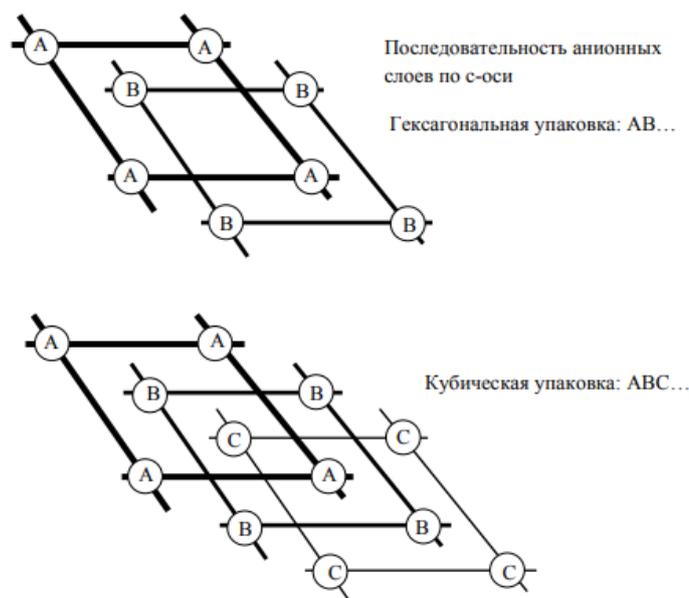


Рисунок 4 – Схемы гексагональной и кубической упаковок анионов

Проведенные исследования термообработки бактериального ферригидрита показывают нам, что данная фаза является неустойчивой, но может сохраняться в длительном времени. Новые магнитные свойства формируются у ферригидрита в процессе отжига [41,59].

K. oxytoca производят вокруг себя секреторный экзополисахарид. Этот полисахарид прикреплен к поверхности бактериальной клетки и состоит из галактозы, глюкуроновой кислоты и рамнозы, которые и проявляют свойства связывания металлов [63].

Экзополисахарид (EPS) *Klebsiella oxytoca* способен связывать различные виды металлов в частности обладает способностью захватывать ионы трехвалентного железа. Исследования с помощью просвечивающей электронной микроскопии показывает, что комплекс ионов железа с экзополисахаридом образует наноструктуры железа, известные как Fe (III)-экзополисахарид (Fe-EPS). Эти имеют слабые магнитные свойства. [64].

Именно наличие такой органической оболочки говорит о внутриклеточном происхождении магнитных частиц.

Известно, что бактерии *Klebsiella oxytoca* в процессе своей жизнедеятельности синтезируют наночастицы минерала ферригидрита $5\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$. Ферригидрит есть в тканях человека и животных, там он входит в состав ферритина. Ферритин – это цитозольный комплекс, представляющий собой капсулу с диаметром около 12 нм, он состоит из 24 полипептидных единиц белка, и называется апоферритином. Внутри апоферритиновой капсулы находится наночастица гидроксида железа. Ферритин имеет минеральное ядро, которое имеет выраженную кристаллическую структуру. Ядро ферритина обладает антиферромагнитным спиновым упорядочением атомов трехвалентного железа [65,66].

На рисунке 5 приведены молекулярные модели ферритина.

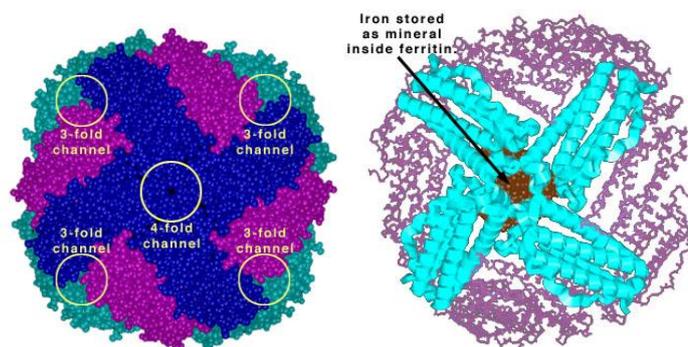


Рисунок 5 – Молекулярные модели ферритина. А. Сфера, образованная 24 белковыми субъединицами. Кружками обозначены места расположения 3-fold и 4-fold каналов. Б. 4-fold канал, сквозь который видно минеральное ядро ферритина.

В белковой оболочке ферритина имеются каналы связывания в местах контакта субъединиц: три полипептидных субъединицы образуют 3-fold каналы (их всего восемь); в местах контакта четырех субъединиц образуются 4-fold каналы (их всего шесть).

Ферритин, обладающий феррооксидазной каталитической активностью, ускоряет реакцию окисления Fe^{2+} , тем самым образуя частицы гидратированного оксида железа внутри пептидной оболочки.

Механизм синтеза минерального ядра ферритина поделен на несколько этапов образования (рис. 6.).

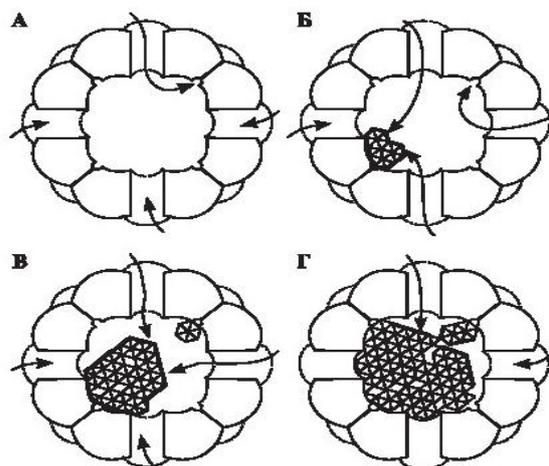


Рисунок 6 – Образование минерального ядра ферритина. А, Б, В, Г — этапы биосинтеза кристаллитов гидратированного оксида железа. Стрелками указаны пути прохождения ионов железа в полость ферритина

Захватывая ионы Fe^{2+} и перенося их через пептидную оболочку в центральную полость, апоферритин в цитоплазме клеток превращается в ферритин, далее происходит их окисление на каталитических центрах и связывание с центрами зарождения кристаллитов. Маленькие кристаллиты ферригидрата затем накапливаются при нарастании дополнительного железа.

Предполагают, что ионы Fe^{2+} транспортируются внутрь ферритина через 3-fold каналы [67].

Среди живых организмов, магнитные наночастицы встречаются не только в бактериях, но также в насекомых, водорослях, клетках птиц и млекопитающих. Насекомые, рыбы, птицы и дельфины обладают способностью ориентироваться по магнитному полю Земли. Есть предположение, что магнитными рецепторами являются кристаллы магнетита, обнаруженные в клетках животных. Микроорганизмы, которые принадлежат

к роду *Leptothrix*, способны производить наночастицы оксидов железа, такие как ферригидрит или лепидокрокит.

1.7 Структура и свойства наночастиц ферригидрита (полученные химическим способом)

Частицы, полученные химическим соосаждением, имеют высокое значение намагниченности. Эти частицы представляют из себя смесь сферической формы и наностержней. Частицы со сферической формой, диаметр которых 5–6 нм, являются суперпарамагнетиками, а частицы похожие на стержни диаметром примерно 5 нм магнитными. Магнитные наночастицы имеют высокоактивную поверхность, которая приводит к высокой сорбционной способности. Химический ферригидрит может быть использован в качестве материала-носителя для целевой доставки лекарств, атак же для высокоспецифичных и высокочувствительных биосенсоров и сорбентов для обнаружения или поиска биомолекул в биологической жидкости. При низких частотах 1 кГц происходит механическое колебание магнитных наночастиц. В переменном магнитном поле эти частицы могут быть использованы в наноразмерной хирургии в качестве ножа для разрушения клеток. Такие наноразмерные образцы представляет собой смесь двух типов частиц: первый тип – это сферические частицы со средним диаметром – 5–6 нм, а второй – стержни с диаметром 5 нм и длиной 30 нм. В тетраэдрическом и октаэдрическом положении стоят катионы Fe^{3+} . Эти частицы стабильны в коллоидном растворе. [61,62].

1.8 Отличие биогенных наночастиц от синтетических

Отличием биогенных наночастиц ферригидрита перед синтетическими аналогами, является наличие у наночастиц органической оболочки, которая обеспечивает высокую биосовместимость, возможность получения

устойчивого золь и хорошие адсорбционные свойства, что позволяет функционализировать наночастицы с лекарственными препаратами.

1.9 Методы обнаружения наночастиц ферригидрита

В данный момент является актуальной проблемой выведения магнитных наночастиц из организма. Сейчас изучается, как частицы ведут себя в организме. Изучается их выведение и распределение по живой системе.

Одним из методов по исследованию миграции магнитных частиц является ЯМР-томография. Главное положительное качество этого метода в том, что он позволяет производить прижизненные исследования распределения интересующих частиц, не требует использования радиоактивных материалов, а также позволяет избежать проблем, связанных с трудностью надежной адсорбции к исследуемым частицам и клеткам различных меток. Помимо этого, использование магнитных наночастиц в качестве меток вводимых в живой организм обладает преимуществами по сравнению с использованием меток на основе GFP, так как селективность оптической люминесцентной визуализации меньше, чем у метода ЯМР

Тем не менее, в применении ЯМР-томографии для визуализации клеток с помощью магнитных наночастиц имеются трудоемкие манипуляции, связанные с их долгосрочным отслеживанием, например, стволовые клетки и клетки-предшественники продолжают активно делиться после трансплантации, что приводит к многократному ослаблению сигнала. Также магнитно-резонансная томография не может различить мертвую клетку от живой, а это значит, что этот способ может дать только косвенные сведения о количестве частиц в ткани [72-75]

Таким образом, магнитные частицы являются перспективным наноматериалом для широкого спектра задач биомедицины и защиты окружающей среды. Частицы не должны быть токсичны для живого

организма и при этом проявлять антибактериальную активность, или служить эффективным средством доставки для антибактериальных препаратов. Целью работы было получить серию наночастиц на основе железа и оценить антибактериальную активность наночастиц и наночастиц, нагруженных антибиотиком, на примере культур *Bacillus pumilus*, *Arthrobacter polychromogenes*, *Escherichia coli*.

2 Материалы и методы

2.1 Получение частиц

Частицы магнетита были получены методом соосаждения несколькими способами.

1 вариант, частицы получали осаждением: 0,4971 г $\text{FeCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ и 1,3517 г $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ либо 0,278 г FeSO_4 и 1,615 г $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ (молярное соотношение Fe(II) и Fe(III) 1:2) растворили в 100 мл dH_2O и добавили по каплям 6 мл NH_4OH (25%) при обработке ультразвуком (УЗТА-0.4/22-ОМ Волна) в течение 10 минут, мощность прибора 90 Вт. Полученный осадок трижды промывали в dH_2O , осаждая частицы с помощью магнита, и использовали в виде:

- a. Частиц без покрытия;
- b. Частиц, покрытых хитозаном. Для этого 100 мг хитозана растворяли в 20 мл 1% раствора уксусной кислоты и инкубировали с частицами в течение ночи при перемешивании, затем осаждали 5 мл NH_4OH (25%) и промывали трижды в dH_2O , осаждая частицы магнитом;
- c. Частиц, покрытых хитозаном в смеси с амоксиклавом. Для этого в раствор хитозана добавляли 0,1 г препарата и после полного растворения обоих компонентов, смешивали с суспензией наночастиц, инкубировали с частицами в течение ночи при перемешивании, затем осаждали 5 мл NH_4OH (25%) и промывали трижды в dH_2O , осаждая частицы магнитом.

2 вариант – наночастицы осаждали в растворе хитозана. Для этого 0,4971 г $\text{FeCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ и 1,3517 г FeCl_3 растворили в 50 мл dH_2O , 100 мг хитозана растворяли в 50 мл 1% уксусной кислоты, растворы смешивали и по каплям добавляли 10 мл NH_4OH (25%), обрабатывая полученный раствор ультразвуком (УЗТА-0.4/22-ОМ Волна) в течение 10 минут при мощности 90 Вт. Затем промывали в dH_2O и осаждали магнитом. Частицы были разделены на 2 части:

- a. Частицы, соосажденные с хитозаном;

в. Частицы с конъюгированным амоксицилином.

Для этого 1 мл суспензии наночастиц, покрытых хитозаном, промывали в 10 мМ NaOH, трижды по 10 минут, и 5 мМ NaOH, трижды по 10 минут, затем инкубировали в растворе EDC (N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride, Sigma) в течение часа при комнатной температуре, промывали в 25 мМ MES-буфере (pH 5,0) и инкубировали с 50 мг амоксиклава в 50 мМ MES-буфере в течение 3 часов. После этого частицы промывали в 50 мМ Tris-HCl (pH 7,5), фосфатным буфером и хранили в фосфатном буфере.

3 вариант – частицы, легированные кобальтом, никелем и цинком.

0,14035 г $\text{NiSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (или 0,1405 г $\text{CoSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, или 0,1437 г $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$) и 0,2705 г $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ растворили в 100 мл dH_2O и добавили по каплям 6 мл NH_4OH (25%) при обработке ультразвуком (УЗТА-0.4/22-ОМ Волна) в течение 10 минут, мощность прибора 90 Вт. Полученный осадок трижды промывали в dH_2O , осаждая частицы с помощью магнита, затем провели обжиг полученного осадка при 700 °С в течение 4 часов. Полученные наночастицы разводили до нужной концентрации в стерильном фосфатном буфере.

2.2 Электронная микроскопия

Полученные частицы исследовали с помощью просвечивающего электронного микроскопа HT7700 (Hitachi).

2.3 Оценка антибактериальной активности.

Оценку антибактериальной активности проводили на трех штаммах: *Escherichia coli* (грамотрицательные бактерии), *Arthrobacter polychromogenes* и *Bacillus pumilus* (грамположительные бактерии) (культуры предоставлены Базовой кафедрой биотехнологии, ИФБиТ, СФУ).

Для оценки антибактериальной активности частиц использовали среду Мюллера-Хинтона (HiMedia, Россия), для поддержания культуры – питательный агар (Nutrient agar) (HiMedia, Россия). Среды готовили в соответствии с инструкцией производителя, стерилизовали автоклавированием при 1,5 Атм.

Посев проводили в стерильных условиях на чашки Петри диаметром 100 мм, в ламинарном шкафу (Lamsystems, БМБ-II-«Ламинар-С»-1,2 NEOTERIC). Для этого делали смывы стерильным фосфатным буфером с каждой культуры, поддерживаемой на питательном агаре в пробирке, разводили суспензии клеток, чтобы соответствовали стандарту мутности МакФарланда 1 ед., полученные суспензии разводили в 10 раз и по 100 мкл суспензии бактерий наносили в каждую чашку Петри, растирали стерильным шпателем, затем высекали отверстия диаметром 5 мм в питательном агаре с помощью металлического резака, и в каждое отверстие капали по 50 мкл частиц, либо раствора антибиотика (в качестве контроля).

Чашки Петри помещали в термостат с температурой 30 ° С.

Через 3 дня проверяли чашки Петри, измеряли зоны лизиса вокруг лунок с частицами.

2.4 Методика по измерению плотности биопленок

Для формирования биопленок были использованы суспензии бактерий *B. pumilus* и *E.coli*, *A. polychromogenes* растущие в жидком питательном бульоне.

Клетки снимали с питательного агара стерильной петлей, разводили в фосфатном буфере до плотности, соответствующей 1,0 стандарту мутности МакФарлайна. Полученную суспензию разводили в 10 раз в питательном триптон-соевом бульоне.

В 96-луночные культуральные планшеты вносили по 100 мкл суспензии бактерий в питательном бульоне, и исследуемые магнитные

наноконплексы до конечной концентрации наночастиц в среде 400 мкг/мл. Пробирки инкубировали в течение 48 часов при 37 °С, в том числе при различных режимах воздействия магнитного поля (50 Гц, 5 мТл, 30 минут, 1 раз в сутки), неприкрепившиеся клетки удаляли, промывали пробирки стерильной дистиллированной водой.

Сформированные биопленки на поверхности пластика окрашивали генциан фиолетовым, 150 мкл 0,1% раствора красителя в течение 15 минут, затем промывали дистиллированной водой, высушивали. Сформированные биопленки оценивали визуально (фотографирование), и спектрофотометрически. Для этого биопленки растворяли в 150 мкл 70% этанола, и измеряли оптическую плотность полученного раствора на длине волны 595 нм на спектрофотометре SPECTROstar® Nano.

2.5 Методика оценки антибактериальной активности с помощью проточного цитофлуориметра CytoFlex S (Beckman)

В 96-луночные планшеты вносили по 100 мкл суспензии бактерий в питательном бульоне, и исследуемые магнитные наноконплексы до конечной концентрации наночастиц в среде 400 мкг/мл. Пробирки инкубировали в течение 48 часов при 37 °С, в том числе при различных режимах воздействия магнитного поля (50 Гц, 5 мТл, 30 минут, 1 раз в сутки). По окончании культивирования по 100 мкл суспензии бактерий переносили с 1,5 мл центрифужные пробирки, доводили фосфатным буфером до 1 мл и добавляли в каждую пробирку 1 мкл раствора резазурина³ (Absam, стоковый раствор 10 мМ), инкубировали 15 минут при комнатной температуре в защищенном от света месте. Анализ проводили с помощью проточного цитометра CytoFlex.

³ Резазурин – слабо флуоресцирующий голубой краситель, который восстанавливается в живых метаболически активных клетках до резорурфина – розового флуоресцирующего соединения

2.6 Статистический анализ.

Все измерения проводили в пяти повторностях. Рассчитывали значения медиан и квартилей, средние значения и стандартные отклонения, достоверными считались результаты при уровне значимости $p < 0,05$. Так же считался критерий Краскела-Уоллиса.

3 Результаты

3.1 Характеристика наночастиц

Полученные частицы фотографировали с помощью электронного микроскопа HT7700 (Hitachi). Было обнаружено, что в зависимости от способа получения, частицы отличаются по размерам и геометрии. В исследованиях с электронным микроскопом было обнаружено, что разные частицы имеют индивидуальные размеры, строение и форму.

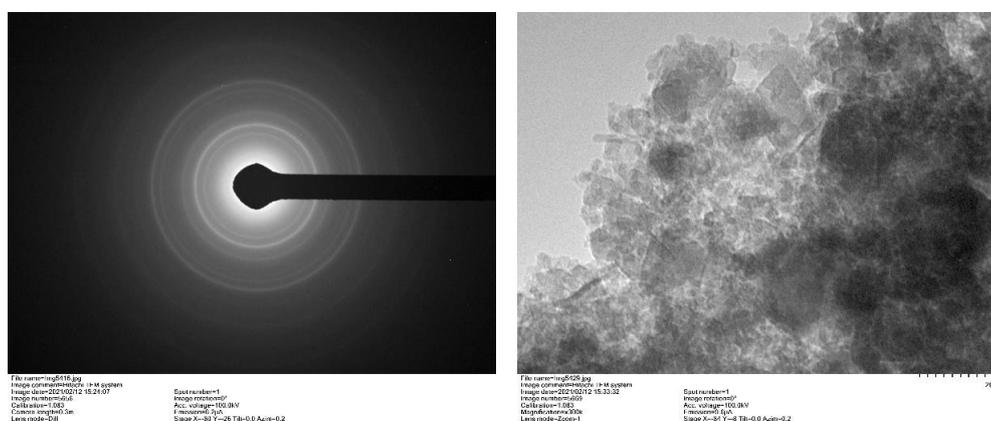


Рисунок 7 – Наночастицы, полученные путем соосаждения FeSO_4 и $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$

Наночастицы, полученные путем соосаждения FeSO_4 и $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$, имели прямоугольную форму, размер варьировал от $27,48 \pm 3,43$ нм. Дифракционный анализ подтвердил образование магнетита Fe_3O_4 .

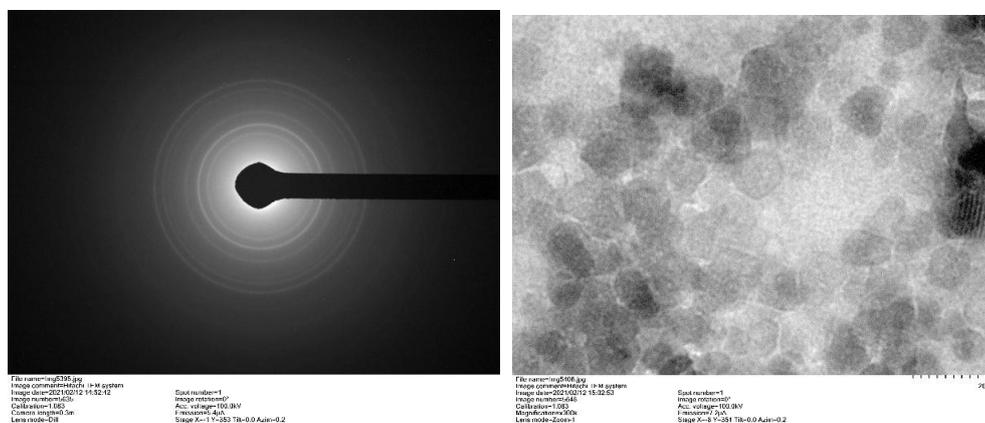


Рисунок 8 – Наночастицы, полученные путем соосаждения FeCl_2 и FeCl_3 (NH_4OH добавляли в раствор солей)

Наночастицы, полученные путем соосаждения FeCl_2 и FeCl_3 , имели в основном неправильную круглую форму, размер примерно $11,07 \pm 1,88$ нм. Дифракционный анализ подтвердил образование магнетита Fe_3O_4 .

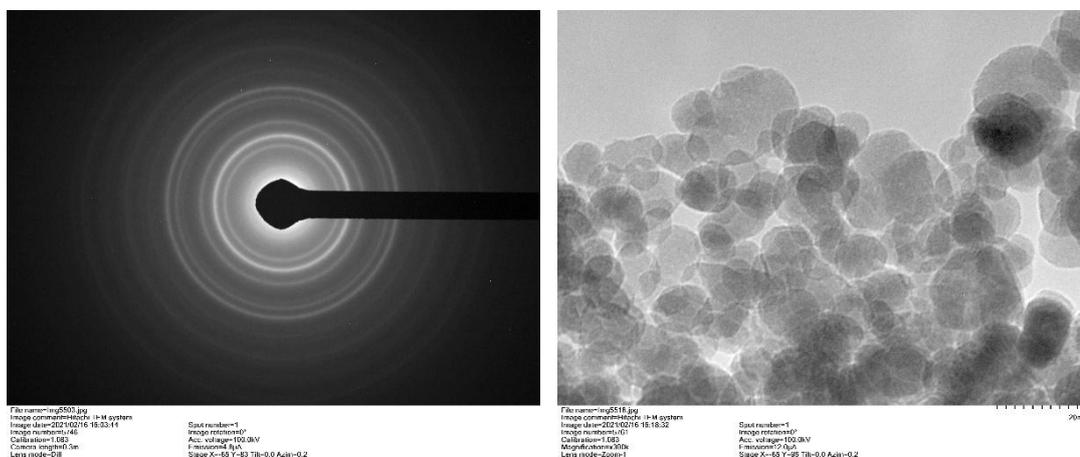


Рисунок 9 – Наночастицы, полученные путем соосаждения FeCl_2 и FeCl_3 (раствор солей добавляли в NH_4OH)

Наночастицы, полученные путем соосаждения FeCl_2 и FeCl_3 , имели округлую (ближе к икосаэдрической) форму. Размер частиц примерно $13,35 \pm 5,59$ нм. Видно, что частицы могут собираться в агломераты.

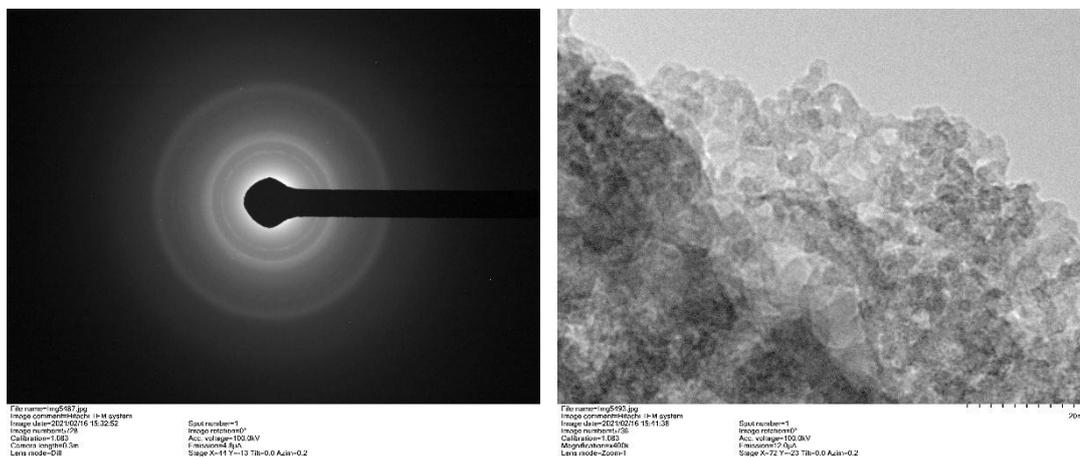


Рисунок 10 – Наночастицы, полученные бактериальным способом

На рисунке 10 мы видим микрофотографию бактериального ферригидрита. Частицы собираются в агломераты. Так же, можно заметить,

что частицы обволачены биологической (мембранной) оболочкой. Частицы с неровными краями, средний размер частиц $3,57 \pm 1,08$ нм.

Для нагружения полисахаридами и антибиотиками были выбраны №3, т.к. они были более однородные по размеру.

Кроме частиц феррита и магемита были синтезированы частицы, легированные никелем, кобальтом и цинком – потенциально токсичными металлами с антибактериальной активностью. Для формирования кристаллической решетки после осаждения наночастицы подвергали обжигу при 700°C .

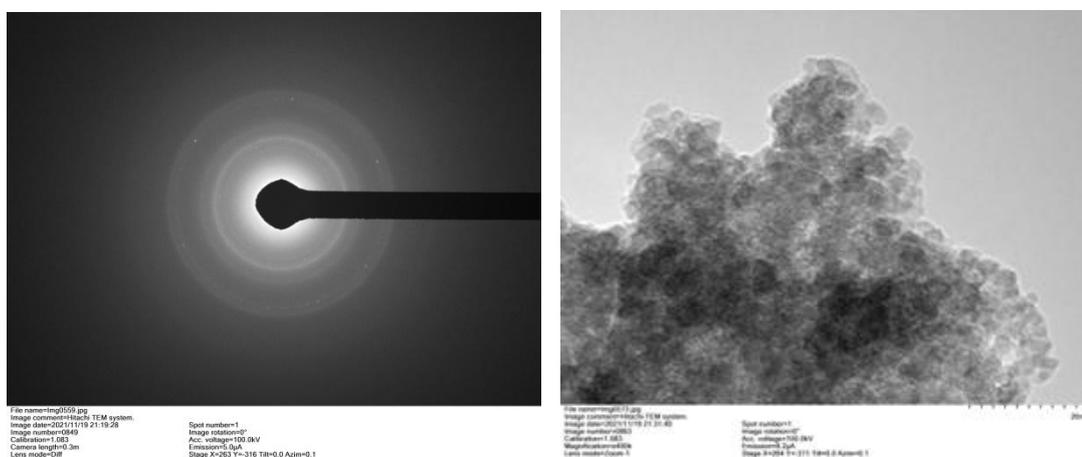


Рисунок 11 – Наночастицы (до обжига), полученные путем соосаждения $\text{CoSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} + \text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$

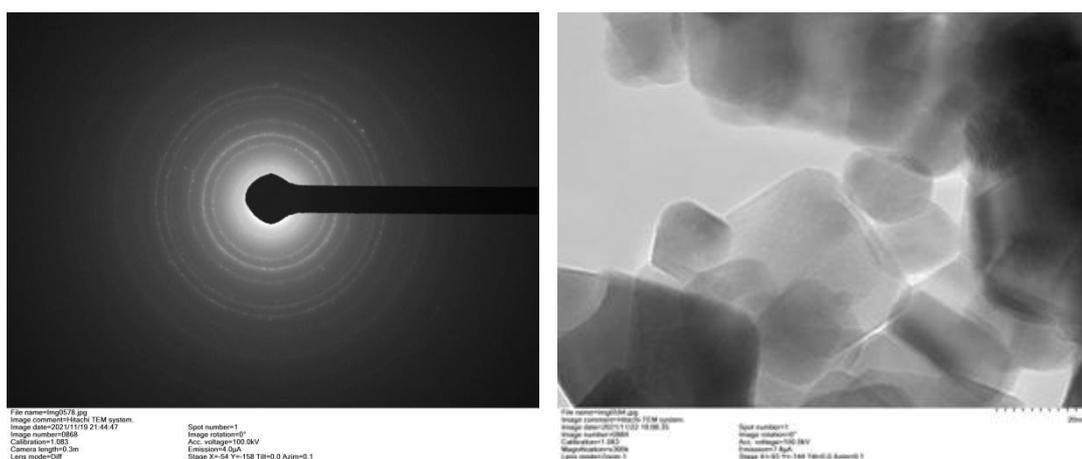


Рисунок 12 – Наночастицы (после обжига), полученные $\text{CoSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} + \text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$

Размер наночастиц феррита кобальта до обжига составил $3,35 \pm 0,76$ нм. Частицы имеют круглую неправильную форму. Могут собираться в агломераты, обладают слабо магнитными свойствами. После обжига частицы приобрели суперпарамагнитные свойства, размер наночастиц составил $29,78 \pm 9,75$ нм. Наночастицы имеют прямоугольную форму (Рисунок 11-12).

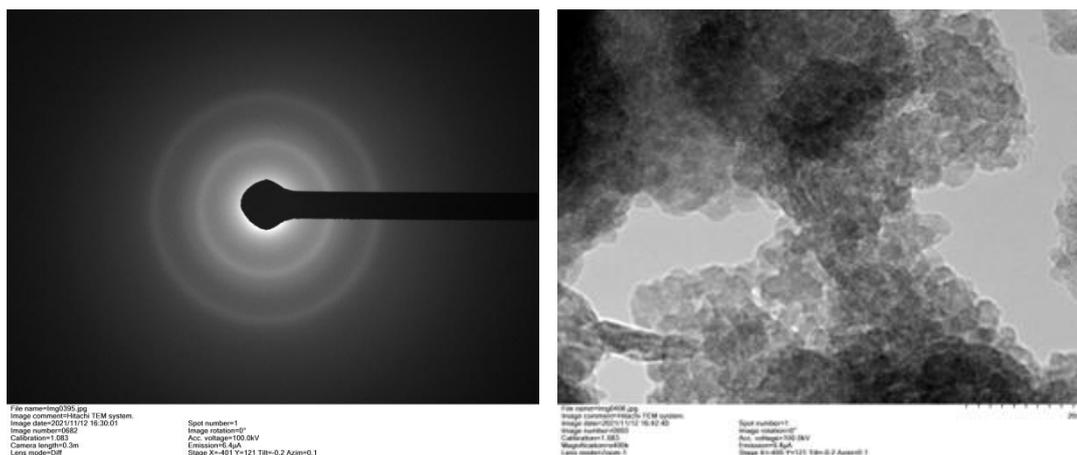


Рисунок 13 – Наночастицы (до обжига), полученные путем соосаждения $\text{NiSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} + \text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$

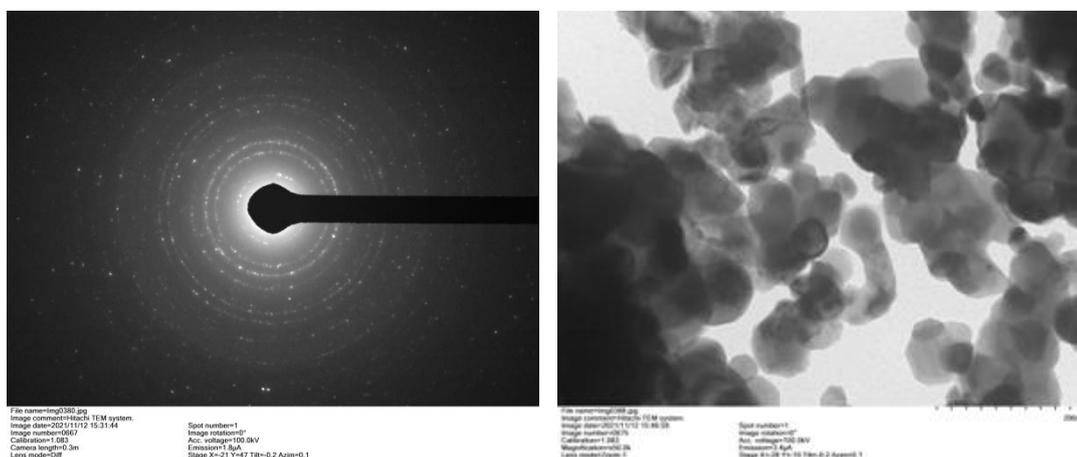


Рисунок 14 – Наночастицы (после обжига), полученные $\text{NiSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} + \text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$

Размер наночастиц до обжига составляет $4,21 \pm 1,06$ нм. Частицы имеют круглую форму. Размер наночастиц после обжига составляет $61,41 \pm 16,68$ нм. Частицы имеют прямоугольную и вытянутую круглую форму. Аналогично с

ферритом кобальта, феррит никеля приобрел парамагнитные свойства после обжига (Рисунок 13-14).

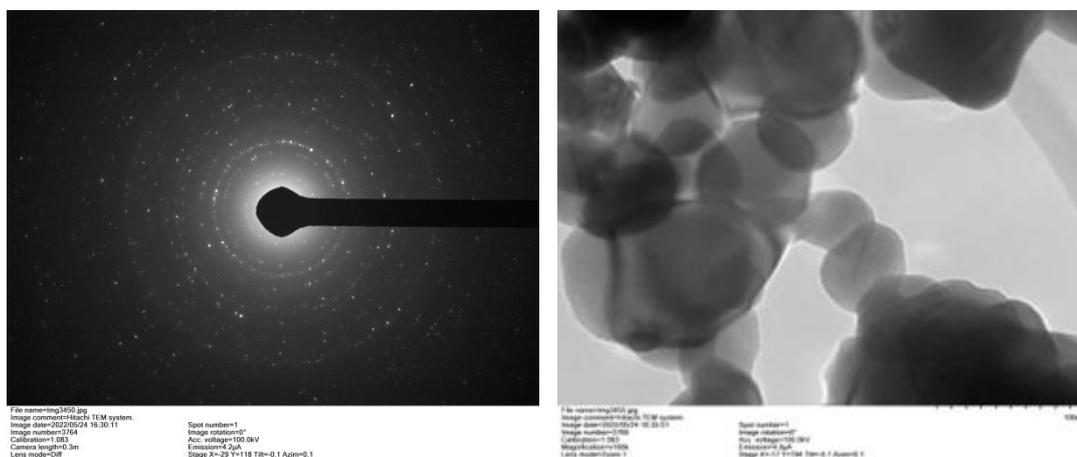


Рисунок 15 – Наночастицы (до обжига), полученные путем соосаждения $ZnSO_4 \times 7H_2O + FeCl_3 \times 6H_2O$

Размер наночастиц до обжига составляет $89,68 \pm 19,56$ нм. Частицы имеют круглую форму с неровной поверхностью.

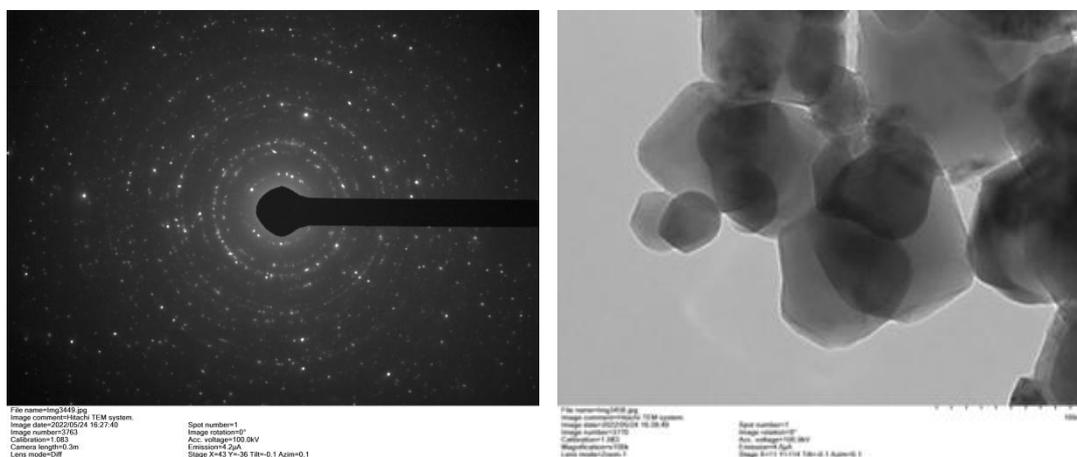


Рисунок 16 – Наночастицы (после обжига), полученные путем соосаждения $ZnSO_4 \times 7H_2O + FeCl_3 \times 6H_2O$

Размер наночастиц после обжига составляет $74,18 \pm 32,53$ нм. Частицы имеют неправильную круглую, овальную форму и низкую намагниченность (Рисунок 15-16).

Для увеличения проникновения наночастиц в клетки, частицы были покрыты полисахаридами хитозаном, дополнительно придающим антибактериальные свойства, и арабиногалактаном.

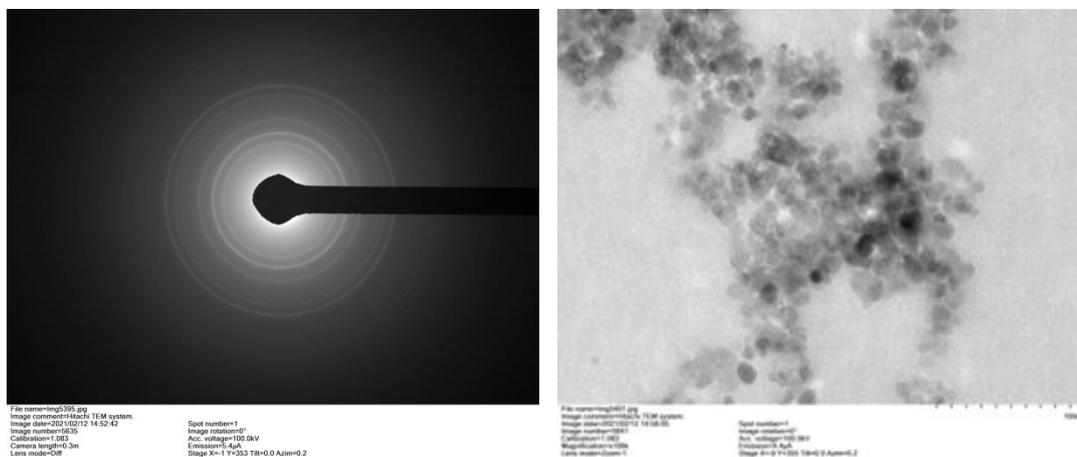


Рисунок 17 – Наночастицы железа с хитозаном, полученные путем соосаждения $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} + \text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O} + (\text{C}_8\text{H}_{13}\text{NO}_5)_n$

Размер наночастиц составляет $13,44 \pm 4,04$ нм. Частицы имеют круглую форму. Агломераты частиц имеют общую хитозановую оболочку.

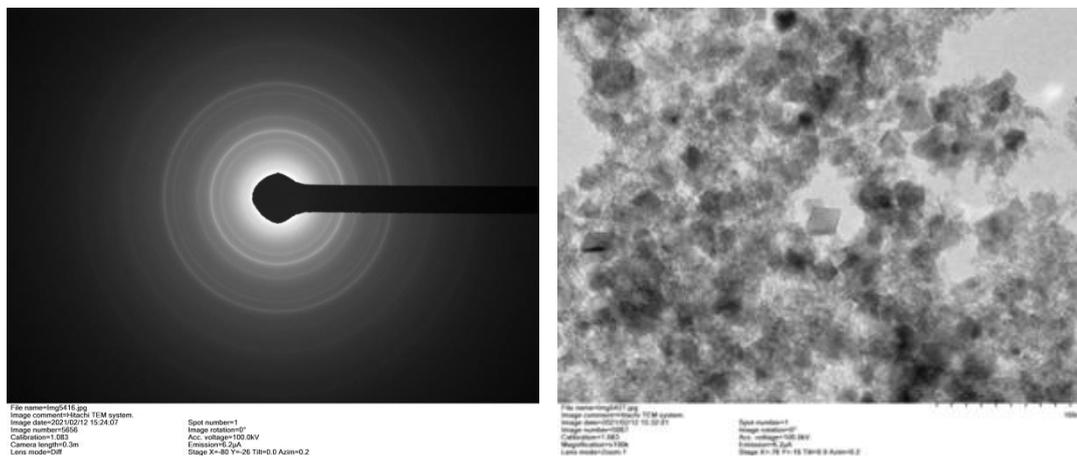


Рисунок 18 – Наночастицы железа с арабиногалактаном, полученные путем соосаждения $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} + \text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O} + [(\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_4)(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_6]_n$

Размер наночастиц составляет $18,10 \pm 4,21$ нм. Частицы имеют квадратную и прямоугольную форму.

Таблица 1 – Размеры и описание формы наночастиц полученных разными способами

| Способ получения наночастиц | Размер наночастиц, нм | Форма наночастиц |
|--|-----------------------|---|
| 1. Наночастицы, полученные путем соосаждения FeSO_4 и $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ | $27,48 \pm 3,43$ | Прямоугольная форма |
| 2. Наночастицы, полученные путем соосаждения FeCl_2 и FeCl_3 (NH_4OH добавляли в раствор солей) | $11,07 \pm 1,88$ | Неправильная круглая форма |
| 3. Наночастицы, полученные путем соосаждения FeCl_2 и FeCl_3 (раствор солей добавляли в NH_4OH) | $13,35 \pm 5,58$ | Округлая (ближе к икосаэдрической) форме |
| 4. Наночастицы, полученные бактериальным способом | $3,57 \pm 1,08$ | Частицы обволочены биологической (мембранной) оболочкой. Частицы с неровными краями |
| 5. Наночастицы (до обжига), полученные путем соосаждения $\text{CoSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} + \text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ | $3,35 \pm 0,76$ | Круглая неправильная форма. Могут собираться в агломераты |
| 6. Наночастицы (после обжига), полученные $\text{CoSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} + \text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ | $29,78 \pm 9,75$ | Прямоугольная форма |
| 7. Наночастицы (до обжига), полученные путем соосаждения $\text{NiSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} + \text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ | $4,21 \pm 1,06$ | Круглая форма |
| 8. Наночастицы (после обжига), полученные $\text{NiSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} + \text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ | $61,41 \pm 16,68$ | Прямоугольная и вытянутая, круглая форма |
| 9. Наночастицы (до обжига), полученные путем соосаждения $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} + \text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ | $89,68 \pm 19,56$ | Круглая форма с неровной поверхностью |
| 10. Наночастицы (после обжига), полученные путем соосаждения $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} + \text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ | $74,18 \pm 32,53$ | Частицы имеют неправильную круглую, овальную форму |
| 11. Наночастицы железа с хитозаном, полученные путем соосаждения $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} + \text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O} + (\text{C}_8\text{H}_{13}\text{NO}_5)_n$ | $13,44 \pm 4,04$ | Круглая. Агломераты частиц имеют общую хитозановую оболочку |
| 12. Наночастицы железа с арабиногалактаном, полученные путем соосаждения $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} + \text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O} + [(\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_4)(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_6]_n$ | $18,10 \pm 4,21$ | квадратная и прямоугольная форма |

3.2 Оценка антибактериальной активности наночастиц по подавлению роста бактерий на твердой питательной среде

Антибактериальную активность проверяли на трех штаммах: грамотрицательные бактерии *E. coli*, грамположительные бактерии *A. polychromogenes* и *B. pumilus*.

На первом этапе оценивали действие железосодержащих частиц и частиц с покрытием хитозаном или арабиногалактаном на микроорганизмы.

1. Частицы, полученные бактериальным способом
2. Частицы, полученные соосаждением FeCl_2 и FeCl_3
3. Частицы с покрытием арабиногалактаном
4. Частицы с покрытием хитозаном.

На рисунке 7 изображена фотография чашки Петри с культурой *Arthrobacter*. Зона лизиса наблюдалась только вокруг лунки №4 (таблица 1).

Таблица 2 - Зоны подавления роста при воздействии частиц на основе железа

| № лунки | <i>Arthrobacter polychromogenes</i> | <i>Bacillus pumilus</i> |
|---|-------------------------------------|-------------------------|
| 1. Частицы, полученные бактериальным способом | - | - |
| 2. Частицы, полученные соосаждением FeCl_2 и FeCl_3 | - | - |
| 3. Частицы с покрытием арабиногалактаном | - | - |
| 4. Частицы с покрытием хитозаном | 1,20±1,64 | 5,30±0,97 |



Рисунок 19 – *Arthrobacter* (слева), *Bacillus* (справа). Лунка №4 магнетит с хитозаном

На рисунке 19 культура *Bacillus* частицы с антибиотиком. В лунке 4 и 5 магнетит с хитозаном и антибиотиком зоны лизиса. В лунке 4 зона лизиса составляет 1 см. Антибиотик с концентрацией 3 мкг/ мл.

На втором этапе оценивали действие железосодержащих частиц и частиц с покрытием хитозаном или арабиногалактаном + антибиотик на микроорганизмы.

1. Частицы + арабиногалактан +антибиотик (3%)
2. Частицы + арабиногалактан
3. Частицы + хитозан +антибиотик (3%)
4. Частицы + хитозан
5. Антибиотик (3%)

Таблица 3 - Зоны подавления роста при воздействии частиц на основе железа

| № лунки | <i>Arthrobacter polychromogenes</i> | <i>Bacillus pumilus</i> |
|---|-------------------------------------|-------------------------|
| 1. Частицы + арабиногалактан +антибиотик (3%) | - | - |
| 2. Частицы + арабиногалактан | - | - |
| 3. Частицы + хитозан +антибиотик (3%) | - | - |
| 4. Частицы + хитозан | 1,3±0,21 | 1,06 ±0,13 |
| 5. Антибиотик (3%) | 1,48±0,64 | 1,66±0,27 |

На рисунке 20 изображена фотография Чашки Петри с культурой *Arthrobacter* и *Bacillus*. Зона лизиса наблюдалась только вокруг лунки №4 и №5 (таблица 2).

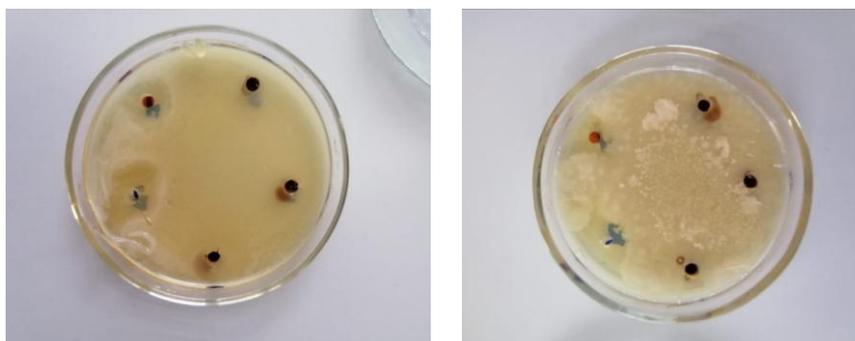


Рисунок 20 – Культура *Arthrobacter* (справа) и *Bacillus* (слева) частицы с антибиотиком. В лунке 4 и 5 магнетит с хитозаном + антибиотик

На рисунке 20 культура *Bacillus* частицы с антибиотиком. В лунке 1 и 2 антибиотика зоны лизиса. Антибиотик с концентрацией 300 мкг/ мл.

На третьем этапе оценивали действие железосодержащих частиц и частиц с покрытием хитозаном или арабиногалактаном + антибиотик на микроорганизмы.

1. Антибиотик (10%)
2. Антибиотик (20%)
3. Хитозан +антибиотик (10%)
4. Хитозан +антибиотик (20%)
5. Арабиногалактан +антибиотик (10%)
6. Арабиногалактан +антибиотик (20%)

Таблица 4 - Зоны подавления роста при воздействии частиц на основе железа

| № лунки | <i>Arthrobacter polychromogenes</i> | <i>Bacillus pumilus</i> |
|--------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------|
| 1. Антибиотик (10%) | 0,86±0 | 2,6±0 |
| 2. Антибиотик (20%) | 1±0 | 2±0 |
| 3. Хитозан +антибиотик (10%) | - | - |
| 4. Хитозан +антибиотик (20%) | - | - |
| 5. Арабиногалактан +антибиотик (10%) | - | - |
| 6. Арабиногалактан +антибиотик (20%) | - | - |

На рисунке 20 изображена фотография чашек Петри с культурой *Arthrobacter* и *Bacillus*. Зона лизиса наблюдалась только вокруг лунки №1 и №2 (таблица 3).

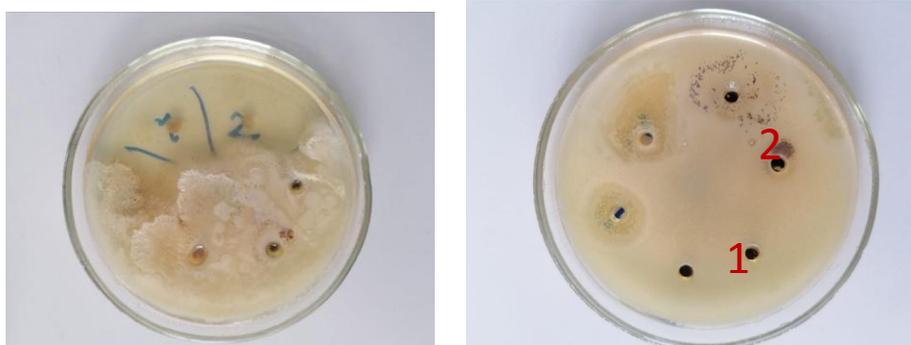


Рисунок 21 – Культура *Arthrobacter* (справа) и *Bacillus* (слева) частицы с антибиотиком и частицы магнетита (нумерация лунок в соответствии с таблицей 3).

1. Амоксиклав (10%)
2. Амоксиклав (20%)
3. Хитозан + амоксиклав (10%)
4. Хитозан + амоксиклав (20%)
5. Арабиногалактан + амоксиклав (10%)
6. Арабиногалактан + амоксиклав (20%)

Зона лизиса наблюдалась вокруг лунок № 1 и 2. У *Arthrobacter* зона лизиса под 1 составляла 1,3 см, а под номером 2 составляла 1,5 см. У *Bacillus* зона лизиса под 1 составляла 3 см, а под номером 2 составляла 2 см.

Таким образом, получение наночастиц, несущих антибиотик, методом абсорбции, оказалось неэффективным.

Далее проводили серию экспериментов по нагрузке наночастиц антибиотиком методом химической пришивки и оценке их антибактериальной активности. Исследовали действие железосодержащих частиц и частиц с покрытием хитозаном на микроорганизмы следующего состава:

1. Fe₃O₄
2. Fe₃O₄, покрытые хитозаном, осажденные NaOH
3. Fe₃O₄, соосажденные с хитозаном, осажденные NaOH
4. Fe₃O₄, покрытые хитозаном, осажденные NH₄OH
5. Fe₃O₄, соосажденные с хитозаном, NH₄OH
6. Fe₃O₄, покрытые хитозаном + галловая кислота
7. Fe₃O₄, покрытые хитозаном в смеси с амоксиклавом
8. Fe₃O₄, покрытые хитозаном + пришивка амоксицилин через EDC-реакцию

Таблица 5 - Зоны подавления роста при воздействии частиц на основе железа

| № лунки | <i>A. polychromogenes</i> | <i>B. pumilus</i> | <i>E. coli</i> |
|---|---------------------------|-------------------|----------------|
| 1. Fe ₃ O ₄ | - | - | - |
| 2. Fe ₃ O ₄ , покрытые хитозаном, | - | - | - |

| № лунки | <i>A. polychromogenes</i> | <i>B. pumilus</i> | <i>E. coli</i> |
|---|---------------------------|-------------------|----------------|
| осажденные NaOH | | | |
| 3. Fe ₃ O ₄ , соосажденные с хитозаном, осажденные NaOH | - | - | - |
| 4. Fe ₃ O ₄ , покрытые хитозаном, осажденные NH ₄ OH | 4 мм | - | - |
| 5. Fe ₃ O ₄ , соосажденные с хитозаном, NH ₄ OH | - | - | - |
| 6. Fe ₃ O ₄ , покрытые хитозаном + галовая кислота | - | - | 1 мм |
| 7. Fe ₃ O ₄ , покрытые хитозаном в смеси с амокси clavом | 4 мм | - | - |
| 8. Fe ₃ O ₄ , покрытые хитозаном + пришивка амоксицилин через EDC | - | - | 2 мм |

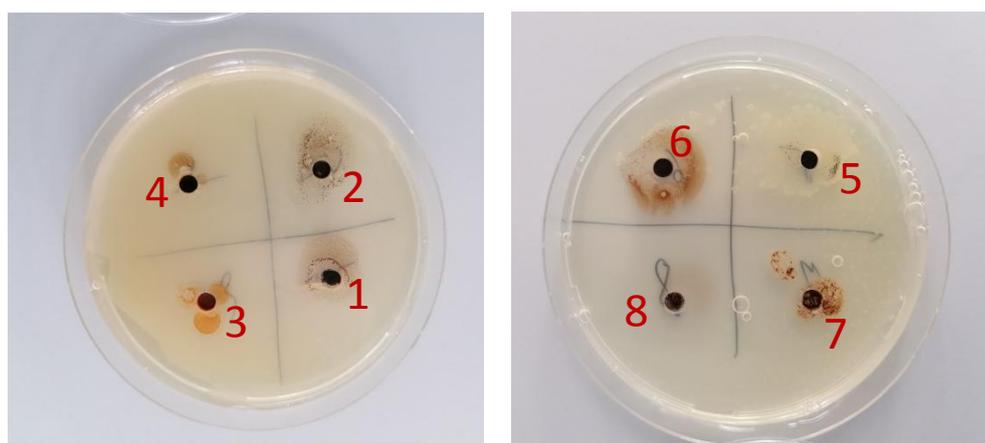


Рисунок 22 – *E. coli* (слева), *B. pumilus* (справа).

На рисунке 22 изображена фотография Чашки Петри с культурой: *E. coli* и *B. pumilus*

1. Fe₃O₄
2. Fe₃O₄, покрытые хитозаном, осажженные NaOH

3. Fe₃O₄, соосажденные с хитозаном, осажденные NaOH
4. Fe₃O₄, покрытые хитозаном, осажденные NH₄OH
5. Fe₃O₄, соосажденные с хитозаном, NH₄OH
6. Fe₃O₄, покрытые хитозаном + галловая кислота
7. Fe₃O₄, покрытые хитозаном в смеси с амоксиклавом
8. Fe₃O₄, покрытые хитозаном + пришивка амоксицилин через EDC

В чашке Петри, где находилась *E. coli* в лунке под № 1 лизис составлял 2 мм, *B. pumilus* в лунке под № 8 лизис составлял 9 мм.

Было установлено, что, несмотря на то, что хитозан считается антибактериальным полисахаридом, в качестве антибактериального покрытия наночастиц хитозан неэффективен. Более того, адсорбция антибиотика на наночастицах, покрытых хитозаном, также неэффективна и на исследованных штаммах грамположительных и грамотрицательных бактериях. Химическая пришивка амоксицилина к хитозану более эффективна, причем антибактериальный эффект наблюдался на грамположительных бактериях и отсутствовал на бактерии *E.coli*. это можно объяснить более сложным строением клеточной стенки грамотрицательных бактерий.

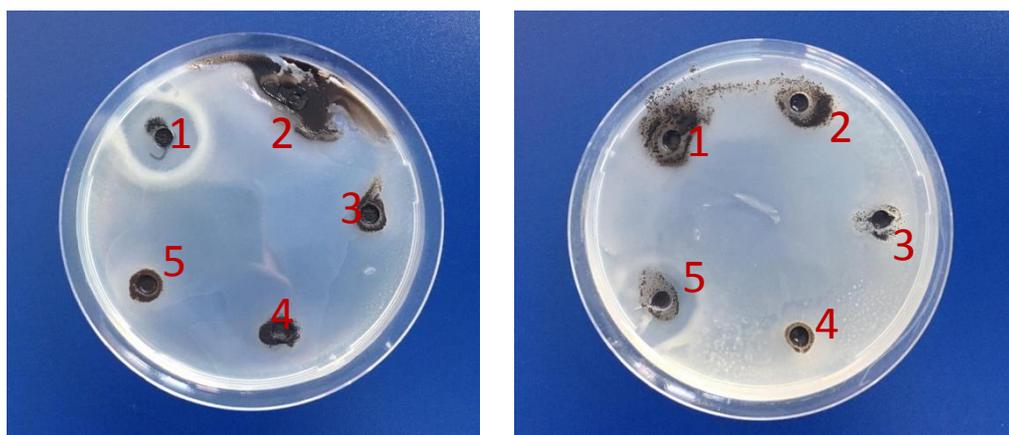


Рисунок 23 – *A. polychromogenes* (слева), *B. pumilus* (справа).

На рисунке 23 культура *B. pumilus* частицы с антибиотиком.

1. Наночастицы Fe₃O₄;
2. Наночастицы Fe₃O₄, покрытые хитозаном;
3. Наночастицы Fe₃O₄, полученные соосаждением с хитозаном;

4. Наночастицы Fe_3O_4 , покрытые хитозаном в смеси с амоксиклавом;
5. Наночастицы Fe_3O_4 , сосажденные с хитозаном и конъюгированные с амоксицилином (EDC-реакция).

A. polychromogenes в лунке под номером 1 лизис составлял 4,5мм, *B. pumilus* в лунке под номером 5 лизис составлял 4,3мм

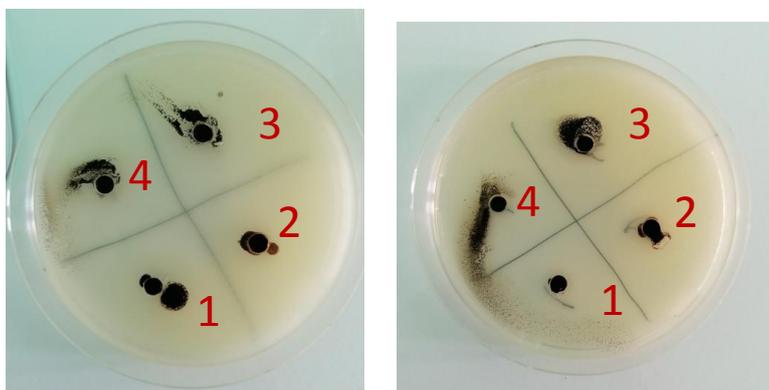


Рисунок 24 – *Arthrobacter* (слева), *Bacillus* (справа).

На третьем этапе оценивали действие железосодержащих частиц с покрытием хитозана или антибиотиком на микроорганизмы. 1. Fe_3O_4 + хитозан, 2. Fe_3O_4 + хитозан + амоксилав (метод адсорбции), 3. Fe_3O_4 + хитозан + амоксилав (EDC - метод), 4. Fe_3O_4 + хитозан + амоксилав (EDC / NHC - метод).

У бактерии *Arthrobacter* на чашке петри не было обнаружено зон лизиса. На чашке петри *Bacillus* на лунке под №3 зона лизиса составляла 5,3 мм. Поскольку нагрузка магнитных наночастиц антибиотиком оказалась неэффективной, были сконструированы легированные наночастицы с ионами кобальта, никеля и цинка, которые обладают токсичными и антибактериальными свойствами.



а

б

в

Рисунок 25 – *E. coli* (а), *B. pumilus* (б), *A. polychromogenes* (в).

- 1- Fe_3O_4 + хитозан
- 2-Амоксицилин + арабиногалактан
- 3- $(\text{Co}+\text{Fe})_3\text{O}_4$
- 4- $(\text{Zn}+\text{Fe})_3\text{O}_4$
- 5- $(\text{Ni}+\text{Fe})_3\text{O}_4$

Было установлено, что происходил на всех 3 чашках лизис бактерий на наночастицах $(\text{Co}+\text{Fe})_3\text{O}_4$. На чашке с *E. coli* под номером 2 так же наблюдалась лизис от взаимодействия антибиотика с арабиногалактаном.

В чашке Петри с бактерией *E. coli* наблюдалась зона лизиса во 2 и 3 лунке 3 и 5 мм. На чашке с *B. pumilus* наблюдался лизис в 3 лунке, размер которой составлял 4 мм. На другой чашке с *A. polychromogenes* наблюдался лизис в 3 лунке, размер которой составлял 3 мм.

Таким образом, получение наночастиц, несущих антибиотик, методом абсорбции, оказалось неэффективным. Нагрузка наночастиц антибиотиком методом химической пришивки более эффективна в отношении грамположительных бактерий. Легированные наночастицы были эффективны в отношении исследованных штаммов грам-положительных, и грам-отрицательной бактерии.

3.3 Оценка антибактериальной активности по формированию бактериальной пленки

Антибактериальную активность в жидкой питательной среде проверяли на трех штаммах: грамотрицательные бактерии *E. coli* и грамположительные бактерии *B. pumilus.*, *A. polychromogenes*

Были исследованы 5 видов наночастиц, в качестве контроля использован раствор антибиотика амоксиклава и бактерии без воздействия:

1. Положительный контроль (бактерии без воздействия);

2. Отрицательный контроль (раствор амоксиклава. Концентрация в среде 1 мкг/мл);
3. Наночастицы Fe₃O₄;
4. Наночастицы Fe₃O₄, покрытие хитозаном;
5. Наночастицы Fe₃O₄, покрытие хитозаном и конъюгированные с амоксициллином;
6. Легированные наночастицы (Co+Fe)₃O₄;
7. Легированные наночастицы (Ni+Fe)₃O₄.

Конечная концентрация наночастиц в питательной среде составила 400 мкг/мл.

После добавления в суспензию бактерий, воздействовали магнитным полем, спустя 24-48 часов планшеты промывали, окрашивали генциан фиолетовым, окрашенные пленки растворяли в 70%-ном спирте и снимали оптическую плотность с помощью спектрофотометра SPECTROstar® Nano. Результаты измерений представлены на рисунке 26-29.

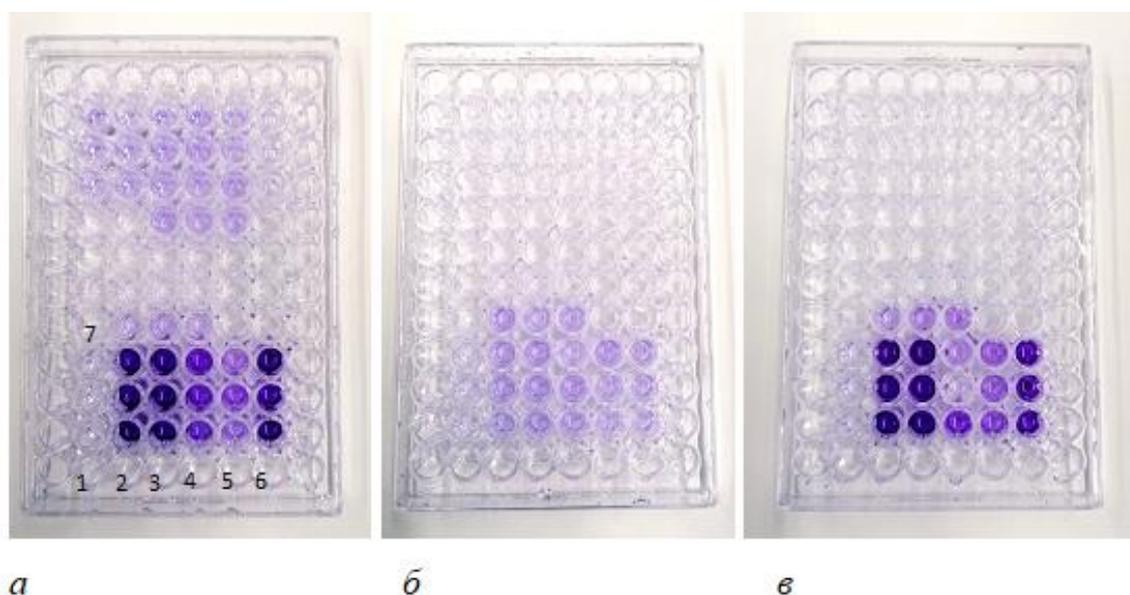


Рисунок 26 – Фотографии многолуночного планшета с бактериями: *a* – *E.coli* и *B. pumilus* без магнитного поля; *б* – *E.coli* после обработки магнитным полем; *в* – *B. pumilus* после обработки магнитным полем. 1. – отрицательный контроль (раствор амоксиклава). 2. – наночастицы Fe₃O₄. 3. – Наночастицы Fe₃O₄, покрытие хитозаном. 4. – Наночастицы

Fe₃O₄, покрытие хитозаном и конъюгированные с амоксициллином. 5. –Легированные наночастицы (Co+Fe)₃O₄. 6. – Легированные наночастицы (Ni+Fe)₃O₄. 7. – положительный контроль (бактерии без воздействия).

После инкубации в магнитном поле бактерии *E.coli* росли хуже с добавлением частиц Fe₃O₄, (Co+Fe)₃O₄, (Ni+Fe)₃O₄, а бактерии *B. pumilus* росли лучше в магнитном поле. При этом для *B. pumilus* магнитное поле способствовало проникновению наночастиц, нагруженных антибиотиком, в бактериальные клетки, что привело к уменьшению образования бактериальной пленки.

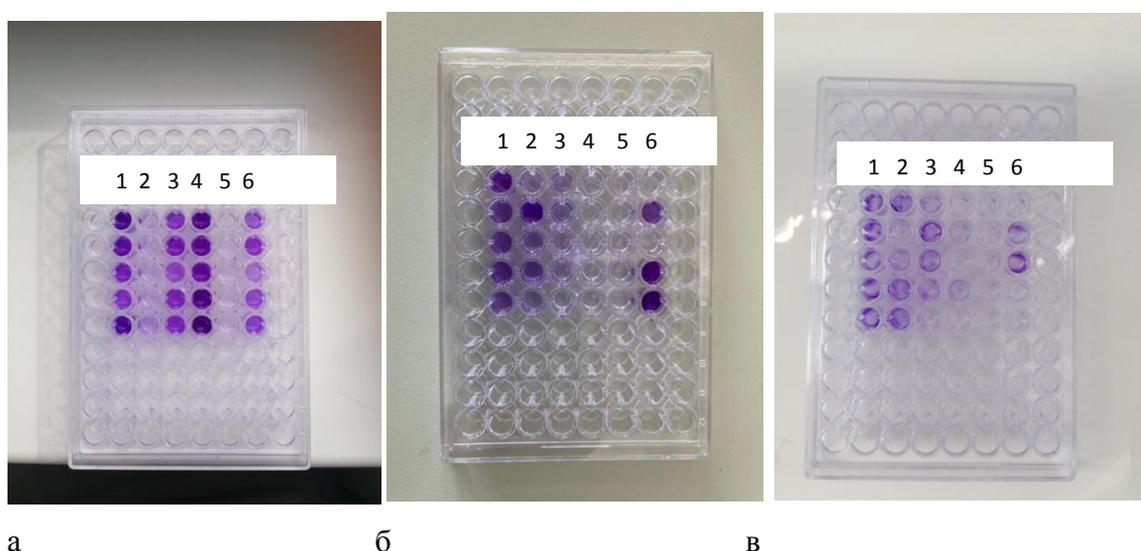


Рисунок 27 – Фотографии многолуночного планшета взаимодействованного с магнитом с бактериями с частотой 50 Hz: а – *E.coli*; б – *B. pumilus*; в – *A. polychromogenes*. 1. – положительный контроль (бактерии без воздействия). 2. – Наночастицы Fe₃O₄. 3. – хитозан и амоксициллин. 4. – Легированные наночастицы (Co+Fe)₃O₄. 5. – Легированные наночастицы (Zn+Fe)₃O₄. 6. –Легированные наночастицы (Ni+Fe)₃O₄.

После инкубации в магнитном поле бактерии *E.coli* образовывали биопленку менее интенсивно в контроле и на частицах феррита кобальта, тогда как при добавлении частиц Fe₃O₄ и феррита цинка биопленка формировалась намного меньше или не формировалась совсем. Для бактерии

V. pumilus менее интенсивное формирование биопленки наблюдалось при добавлении частиц, покрытых хитозаном, частиц феррита кобальта и цинка (Рисунок 27).

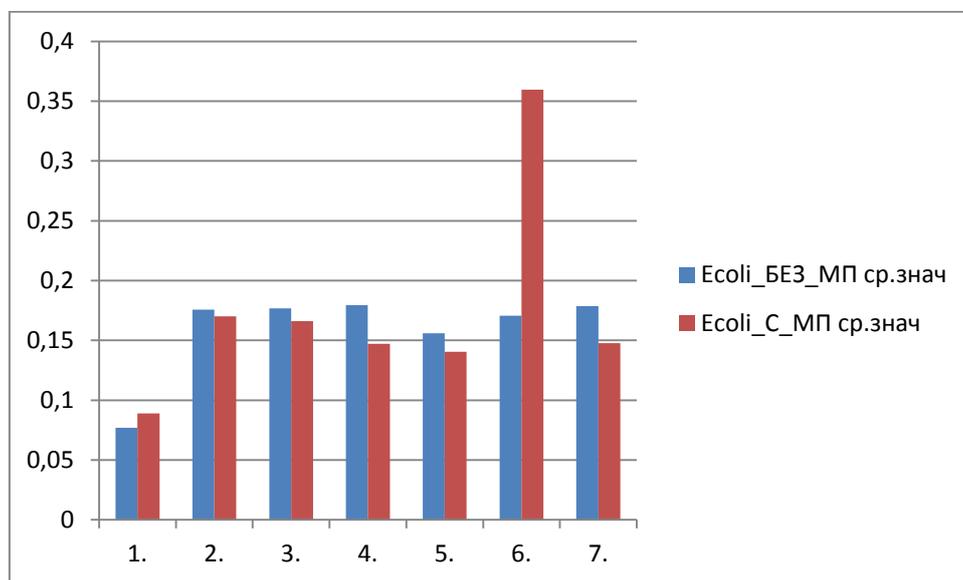


Рисунок 28 – Диаграмма сравнения биопленок грамотрицательных бактерий *E. coli* с применением магнитного поля и без магнитного поля среднее значение. 1. – отрицательный контроль (раствор амоксиклава). 2. – наночастицы Fe₃O₄. 3. – Наночастицы Fe₃O₄, покрытие хитозаном. 4. – Наночастицы Fe₃O₄, покрытие хитозаном и конъюгированные с амоксициллином. 5. – Легированные наночастицы (Co+Fe)₃O₄. 6. – Легированные наночастицы (Ni+Fe)₃O₄. 7. – положительный контроль (бактерии без воздействия).

Для бактерий *E. coli* при добавлении наночастиц и воздействии магнитным полем происходило подавление формирования бактериальной пленки на 3-18% по сравнению с образцами без воздействия магнитного поля. При этом в образце негативного контроля (обработка раствором антибиотика) оптическая плотность окрашенной биопленки выросла на 15%.

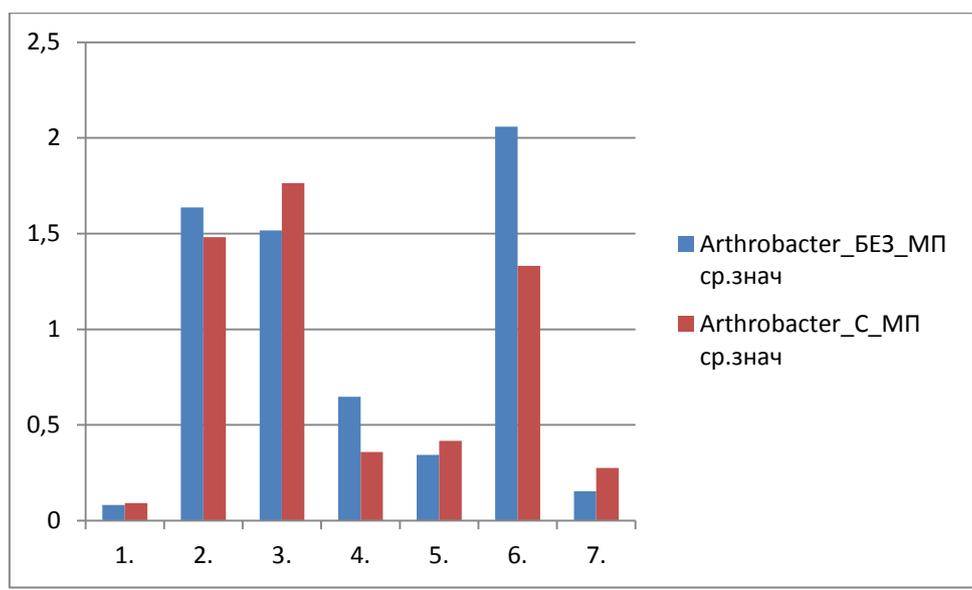


Рисунок 29 – Диаграмма сравнения биопленок грамположительных бактерий *Arthrobacter polychromogenes* с применением магнита и без магнита среднее значение. 1. – Антибиотик амоксиклав. 2. – наночастицы Fe₃O₄. 3. – Наночастицы Fe₃O₄, покрытие хитозаном. 4. – Наночастицы Fe₃O₄, покрытие хитозаном и конъюгированные с амоксициллином. 5. –Легированные наночастицы (Co+Fe)₃O₄. 6. – Легированные наночастицы (Ni+Fe)₃O₄. 7. – положительный контроль (бактерии без воздействия).

При воздействии магнитным поле на бактерии *B. pumilus* формирование бактериальной пленки снижалось на 9-35% при добавлении наночастиц Fe₃O₄, наночастиц Fe₃O₄, покрытых хитозаном и конъюгированных с амоксициллином, наночастиц, легированных никелем, и увеличивалось на 16-21% при добавлении наночастиц Fe₃O₄, покрытых хитозаном, и в контроле – бактерии без воздействия. При воздействии антибиотиком разница в формировании бактериальной пленки была незначительной.

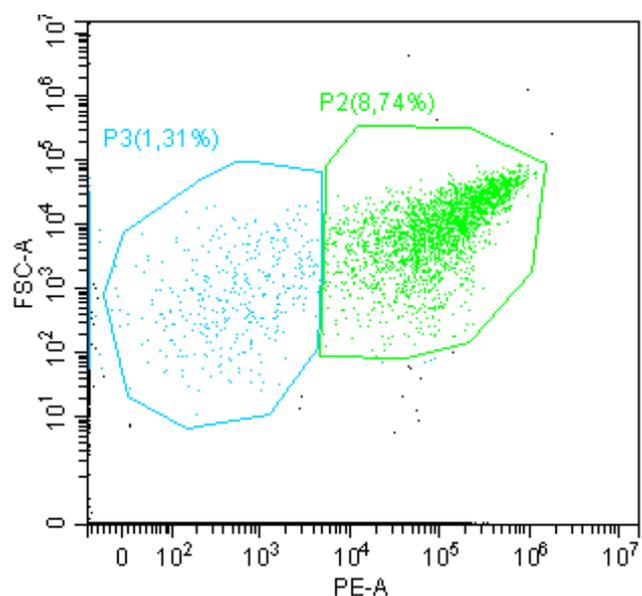


Рисунок 30 – Результаты оценки состояния культуры бактерий *E.coli* без добавления наночастиц. Зеленая популяция – живые бактерии (клетки с интенсивной флуоресценцией), синяя популяция – мертвые и неактивные бактерии.

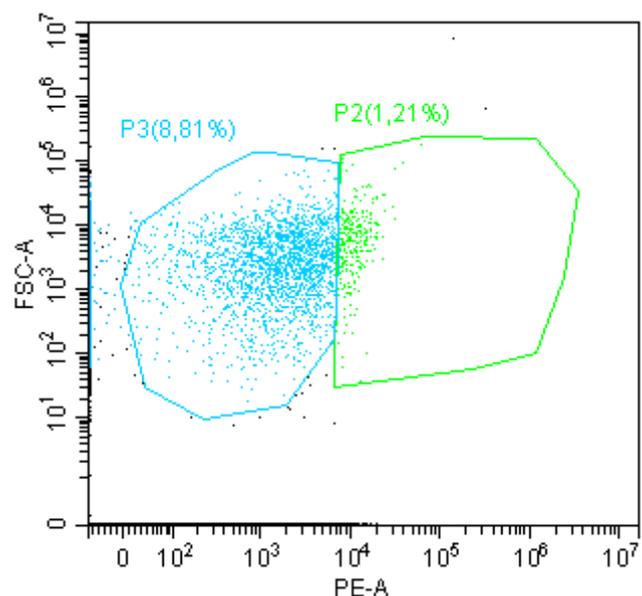


Рисунок 31 – Результаты оценки состояния культуры бактерий *E.coli* после добавления наночастиц. Зеленая популяция – живые бактерии (клетки с интенсивной флуоресценцией), синяя популяция – мертвые и неактивные бактерии.

По результатам проточной цитометрии было установлено, что добавление магнитных наночастиц привело к снижению активных живых клеток с 86,96 % до 12,07%, количество мертвых микроорганизмов или

клеток с замедленным метаболизмом выросло с 13,04% до 87,93% (Рисунок 30-31).

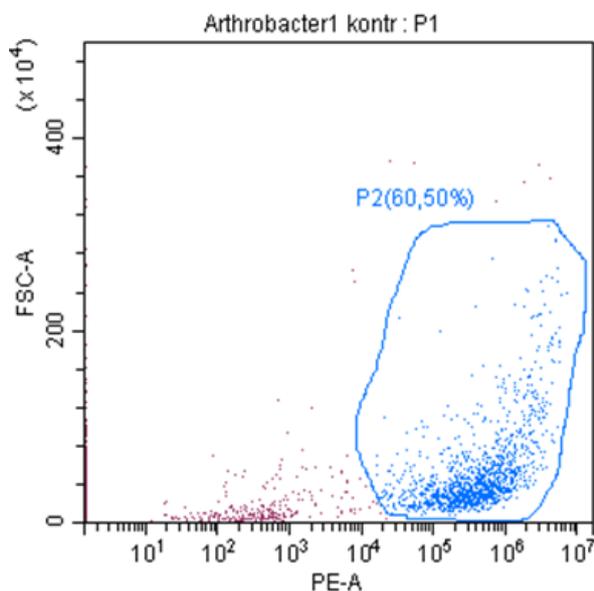


Рисунок 32 – Результаты оценки состояния культуры бактерий *A. polychromogenes* без добавления наночастиц.

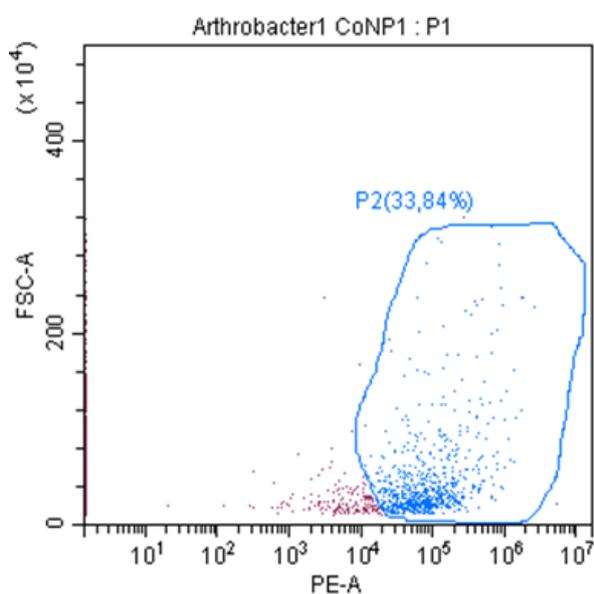


Рисунок 33 – Результаты оценки состояния культуры бактерий *A. polychromogenes* после добавления наночастиц

По результатам проточной цитометрии было установлено, что добавление магнитных наночастиц привело к снижению активных живых клеток. Количество активных клеток в исходной культуре составило 74,94%,

после добавления частиц феррита кобальта количество живой культуры составляло 40,25%. (Рисунок 32-33).

Далее провели анализ результатов измерения оптической плотности окрашенных бактериальных пленок. Обнаружено, что разные частицы в одинаковых концентрациях по-разному влияют на разные штаммы бактерий. На первом этапе этой части исследований использовали наночастицы, не подвергнутые обжигу, со слабыми магнитными свойствами. Для грам-отрицательной *E.coli* токсичными были частицы, легированные цинком и с хитозановым покрытием. Наночастицы, легированные никелем, и нагруженные амоксициллином, также подавляли рост бактерий, а наночастицы, легированные кобальтом, стимулировали рост бактерий сопоставимо с контролем. Полученные результаты были аналогичными до и после воздействия магнитного поля в разных частотных режимах (Рисунок 34-37).

По оси ординат расположена плотность биопленок

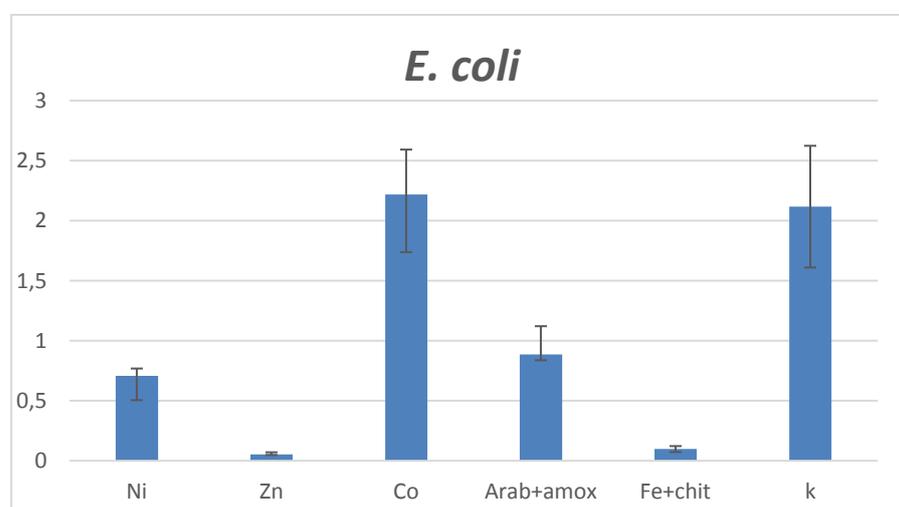


Рисунок 34 – Диаграмма сравнения биопленок грамотрицательных бактерий *E. Coli* контроль без магнитного поля медиана и квартили. 1. – Наночастицы (Ni+Fe) $3O_4$. 2. – Наночастицы (Zn+Fe) $3O_4$. 3. – Легированные наночастицы (Co+Fe) $3O_4$. 4. – Арабиногалактан + амоксициллин. 5. – Наночастицы Fe $3O_4$, покрытие хитозаном. 6. – Положительный контроль (бактерии без воздействия).

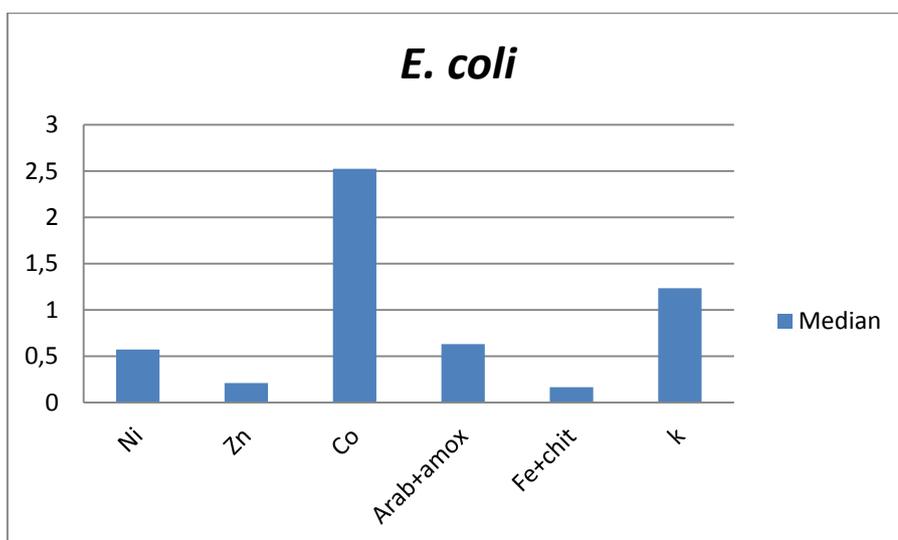


Рисунок 35 – Диаграмма сравнения биопленок грамотрицательных бактерий *E. Coli* с магнитным полем с частотой 10 Гц медиана. 1. – Наночастицы (Ni+Fe)3O4. 2. – Наночастицы (Zn+Fe)3O4. 3. – Легированные наночастицы (Co+Fe)3O4. 4. – Арабиногалактан + амоксициллин. 5. – Наночастицы Fe3O4, покрытие хитозаном. 6. – Положительный контроль (бактерии без воздействия).

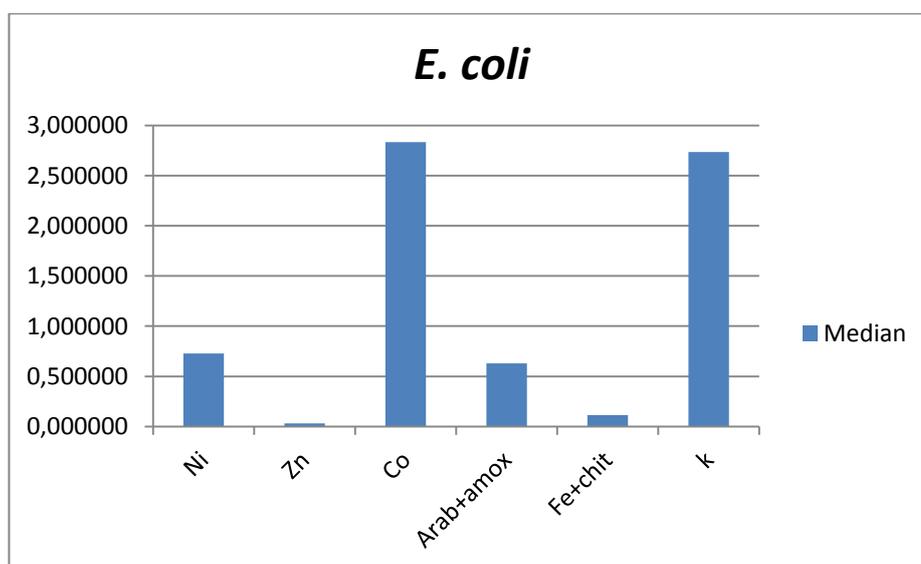


Рисунок 36 – Диаграмма сравнения биопленок грамотрицательных бактерий *E. coli* с магнитным полем с частотой 50 Гц медиана. 1. – Наночастицы (Ni+Fe)3O4. 2. – Наночастицы (Zn+Fe)3O4. 3. – Легированные наночастицы (Co+Fe)3O4. 4. – Арабиногалактан + амоксициллин. 5. – Наночастицы Fe3O4, покрытие хитозаном. 6. – Положительный контроль (бактерии без воздействия).

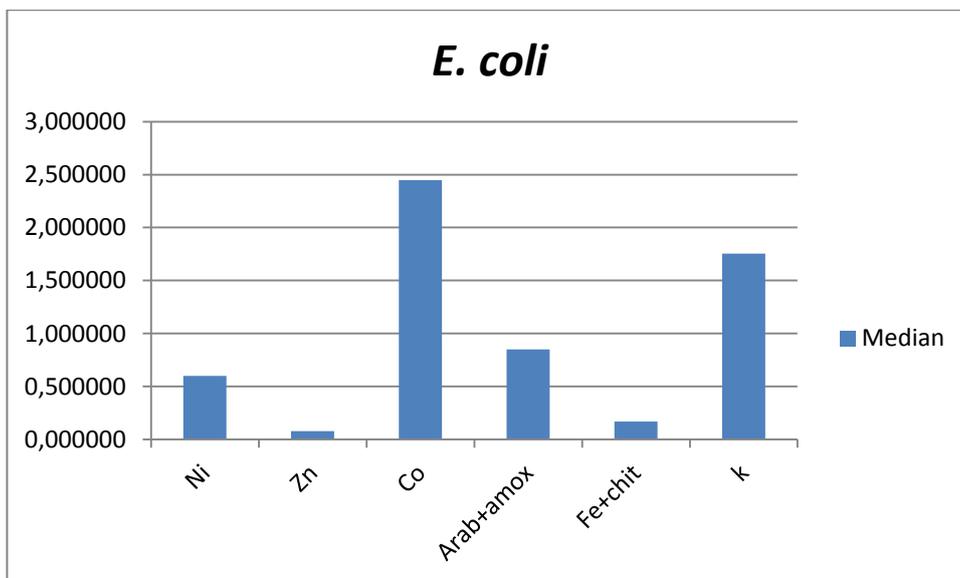


Рисунок 37 – Диаграмма сравнения биопленок грамотрицательных бактерий *E. Coli* с магнитным полем с частотой 100 Гц медиана. 1. – Наночастицы (Ni+Fe) $3O_4$. 2. – Наночастицы (Zn+Fe) $3O_4$. 3. – Легированные наночастицы (Co+Fe) $3O_4$. 4. – Арабиногалактан + амоксициллин. 5. – Наночастицы Fe $3O_4$, покрытие хитозаном. 6. – Положительный контроль (бактерии без воздействия).

Для грам-положительных бактерий *B.pumilus* токсичными были частицы, легированные цинком, кобальтом, покрытые хитозаном и конъюгированные с амоксициллином, при этом частицы, легированные никелем, стимулировали рост. (Рисунок 38-41)

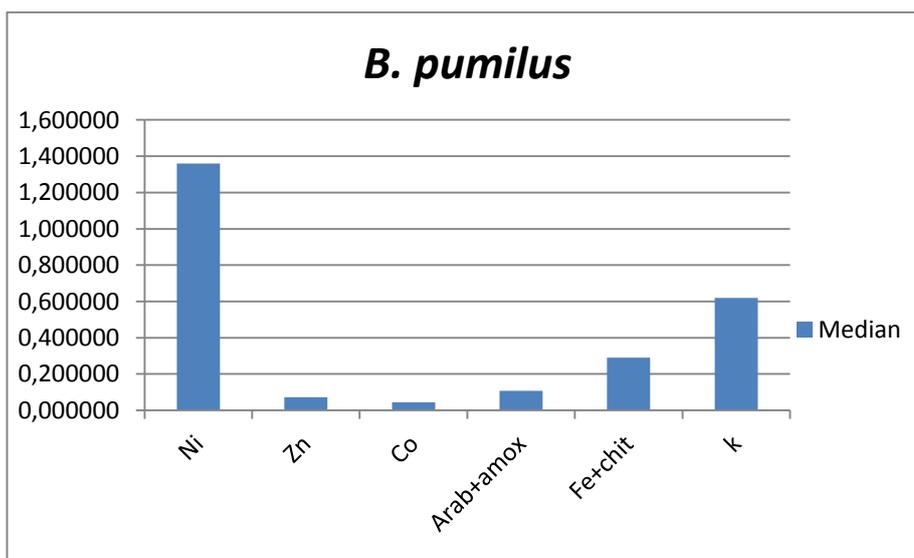


Рисунок 38 – Диаграмма сравнения биопленок грамположительных бактерий *Bacillus pumilus* контроль без магнитного поля медиана. 1. – Наночастицы (Ni+Fe) $3O_4$. 2. – Наночастицы (Zn+Fe) $3O_4$. 3. – Легированные наночастицы (Co+Fe) $3O_4$. 4. –

Арабиногалактан + амоксициллин. 5. – Наночастицы Fe₃O₄, покрытие хитозаном. 6. – Положительный контроль (бактерии без воздействия).

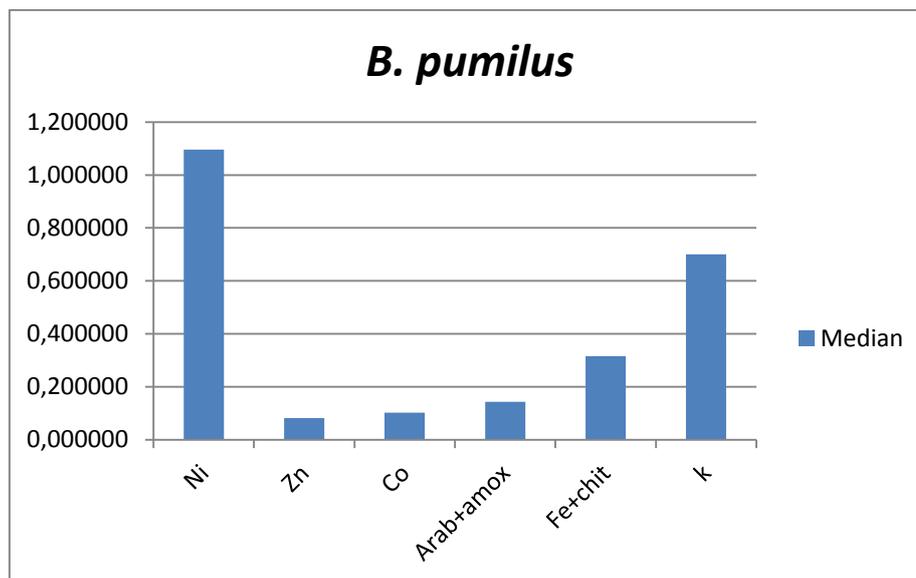


Рисунок 39 – Диаграмма сравнения биопленок грамположительных бактерий *Bacillus pumilus* с магнитным полем с частотой 10 Гц медиана. 1. – Наночастицы (Ni+Fe)₃O₄. 2. – Наночастицы (Zn+Fe)₃O₄. 3. – Легированные наночастицы (Co+Fe)₃O₄. 4. – Арабиногалактан + амоксициллин. 5. – Наночастицы Fe₃O₄, покрытие хитозаном. 6. – Положительный контроль (бактерии без воздействия).

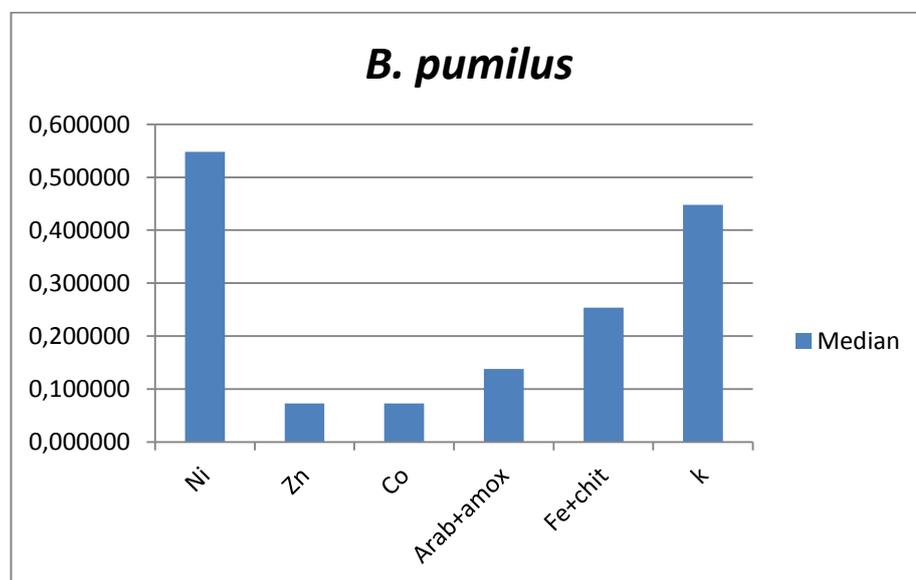


Рисунок 40 – Диаграмма сравнения биопленок грамположительных бактерий *Bacillus pumilus* с магнитным полем с частотой 50 Гц медиана. 1. – Наночастицы (Ni+Fe)₃O₄. 2. – Наночастицы (Zn+Fe)₃O₄. 3. – Легированные наночастицы (Co+Fe)₃O₄. 4. – Арабиногалактан + амоксициллин. 5. – Наночастицы Fe₃O₄, покрытие хитозаном. 6. – Положительный контроль (бактерии без воздействия).

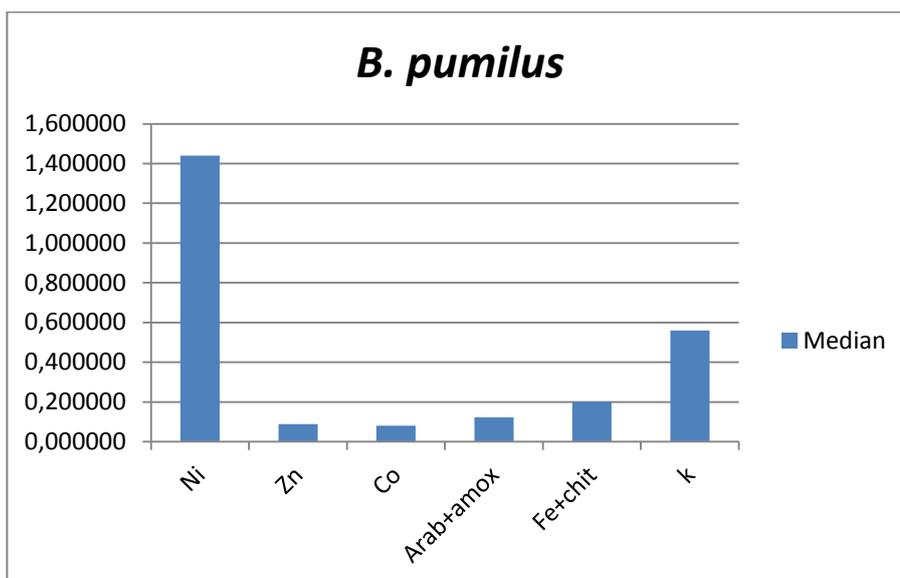


Рисунок 41 – Диаграмма сравнения биопленок грамположительных бактерий *Bacillus pumilus* с магнитным полем с частотой 100 Гц медиана. 1. – Наночастицы (Ni+Fe) $3O_4$. 2. – Наночастицы (Zn+Fe) $3O_4$. 3. – Легированные наночастицы (Co+Fe) $3O_4$. 4. – Арабиногалактан + амоксициллин. 5. – Наночастицы Fe $3O_4$, покрытие хитозаном. 6. – Положительный контроль (бактерии без воздействия).

Для грам-положительных *A. polychromogenes* все исследуемые наночастицы подавляли рост, их действие было усиленно в магнитном поле при разных параметрах воздействия. (Рисунок 42-45)

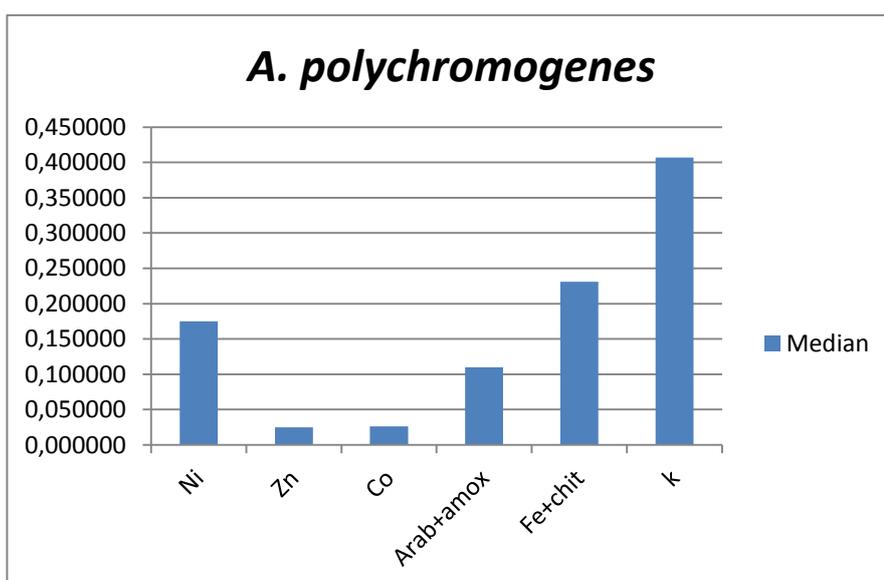


Рисунок 42 – Диаграмма сравнения биопленок грамположительных бактерий *Arthrobacter polychromogenes* контроль без магнитного поля медиана. 1. – Наночастицы (Ni+Fe) $3O_4$. 2. – Наночастицы (Zn+Fe) $3O_4$. 3. – Легированные наночастицы (Co+Fe) $3O_4$. 4. – Арабиногалактан + амоксициллин. 5. – Наночастицы Fe $3O_4$, покрытие хитозаном. 6. – Положительный контроль (бактерии без воздействия).

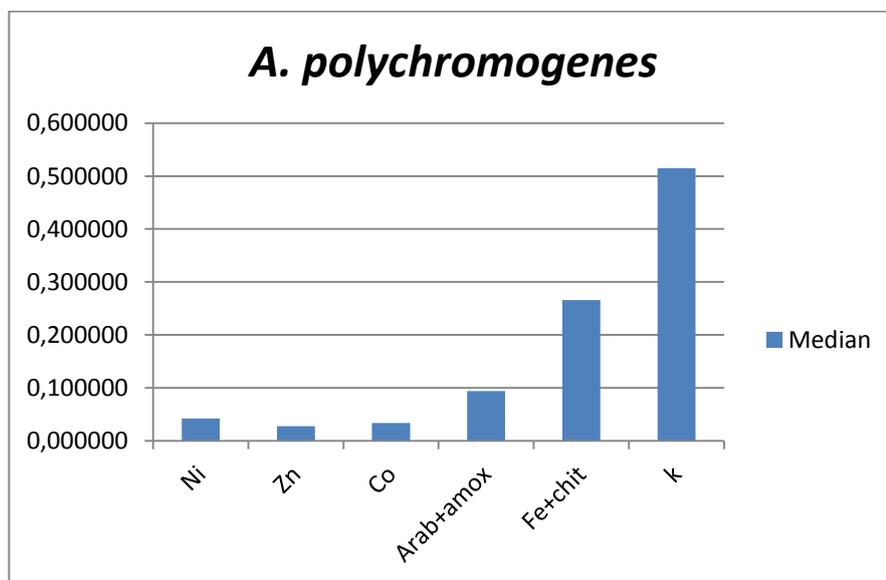


Рисунок 43 – Диаграмма сравнения биопленок грамположительных бактерий *Arthrobacter polychromogenes* с магнитным полем с частотой 10 Гц медиана. 1. – Наночастицы (Ni+Fe) $3O_4$. 2. – Наночастицы (Zn+Fe) $3O_4$. 3. – Легированные наночастицы (Co+Fe) $3O_4$. 4. – Арабиногалактан + амоксициллин. 5. – Наночастицы Fe $3O_4$, покрытие хитозаном. 6. – Положительный контроль (бактерии без воздействия).

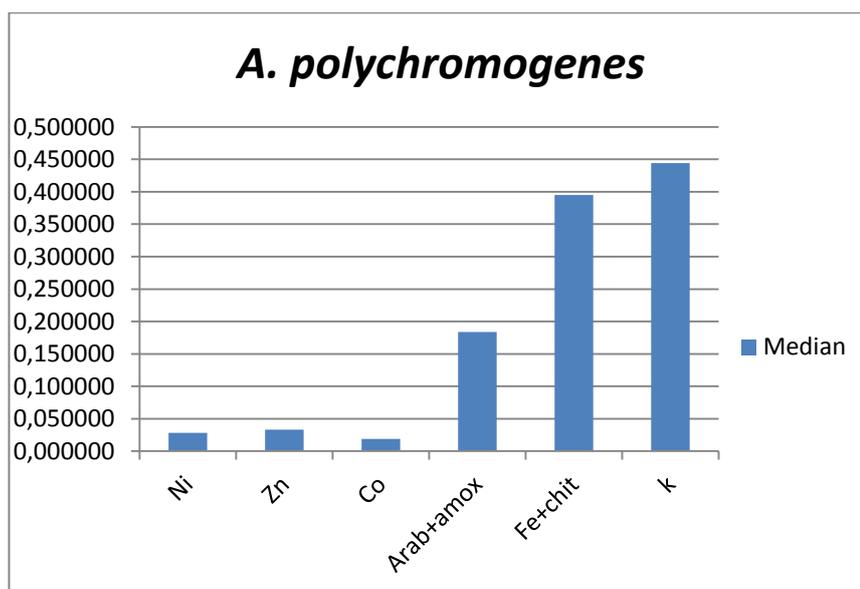


Рисунок 44 – Диаграмма сравнения биопленок грамположительных бактерий *Arthrobacter polychromogenes* с магнитным полем с частотой 50 Гц медиана. 1. –

Наночастицы (Ni+Fe)3O4. 2. – Наночастицы (Zn+Fe)3O4. 3. – Легированные наночастицы (Co+Fe)3O4. 4. – Арабиногалактан + амоксициллин. 5. – Наночастицы Fe3O4, покрытие хитозаном. 6. – Положительный контроль (бактерии без воздействия).

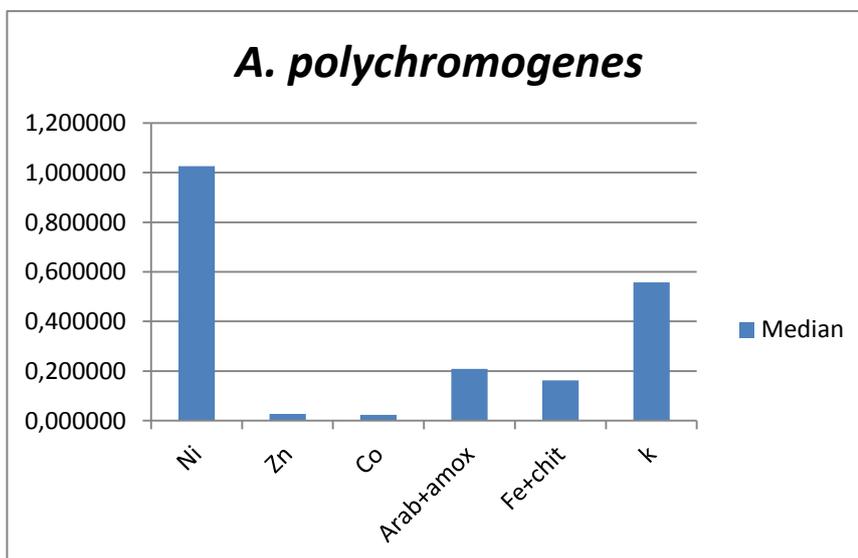


Рисунок 45 – Диаграмма сравнения биопленок грамположительных бактерий *Arthrobacter polychromogenes* с магнитным полем с частотой 100 Гц медиана. 1. – Наночастицы (Ni+Fe)3O4. 2. – Наночастицы (Zn+Fe)3O4. 3. – Легированные наночастицы (Co+Fe)3O4. 4. – Арабиногалактан + амоксициллин. 5. – Наночастицы Fe3O4, покрытие хитозаном. 6. – Положительный контроль (бактерии без воздействия).

Далее провели оценку легированных наночастиц после обжига, с упорядоченной кристаллической структурой и сильными магнитными свойствами. Для бактерий *E. coli*, *B. pumilus* все наночастицы без воздействия магнитного поля оказались токсичными, при этом для *A. polychromogenes* частицы, легированные кобальтом, стимулировали рост бактерий. После обработки магнитным полем результаты оказались другими: у всех трех штаммов бактерий происходило более активное формирование биопленки при добавлении частиц, легированных цинком, по сравнению с контролем. (Рисунок 46-51)

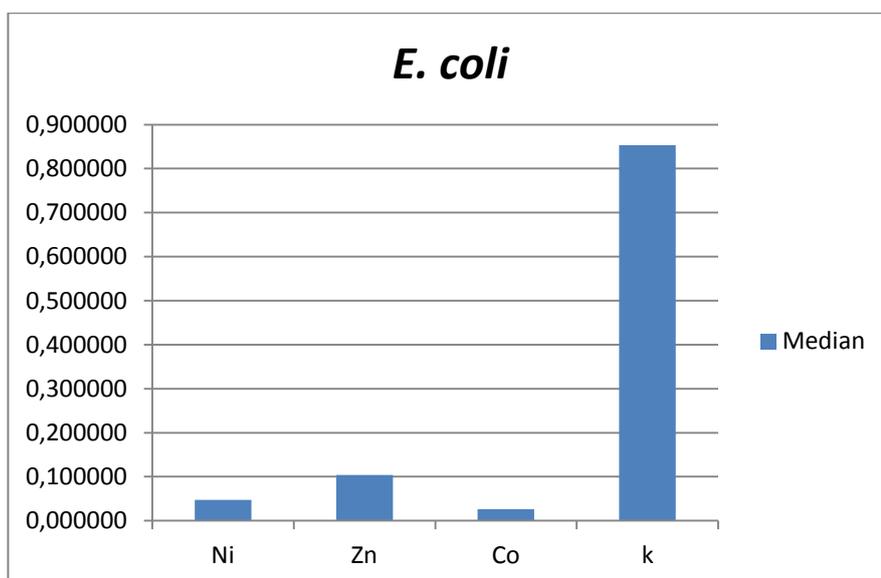


Рисунок 46 – Диаграмма сравнения биопленок грамотрицательных бактерий *E. coli* контроль без магнитного поля медиана. 1. – Наночастицы (Ni+Fe) $3O_4$. 2. – Наночастицы (Zn+Fe) $3O_4$. 3. – Наночастицы (Co+Fe) $3O_4$. 4. – Положительный контроль (бактерии без воздействия).

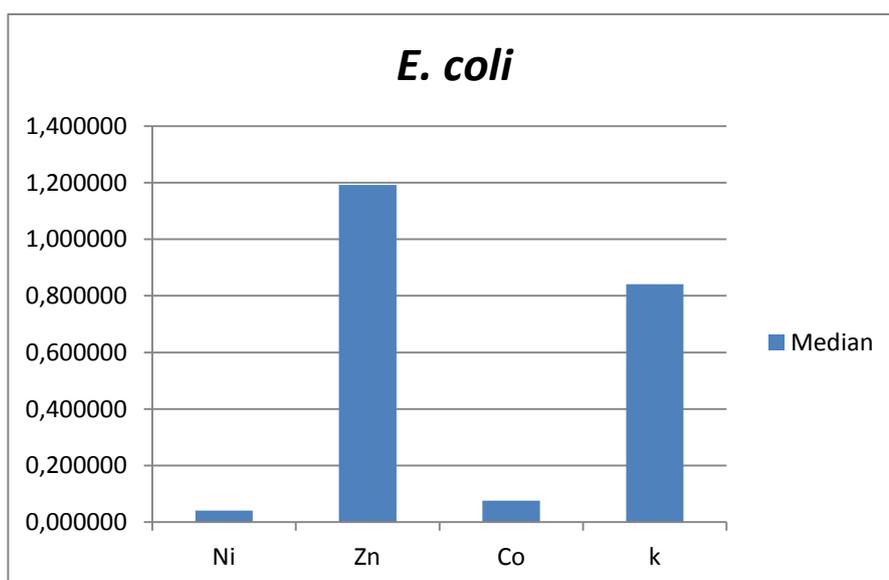


Рисунок 47 – Диаграмма сравнения биопленок грамотрицательных бактерий *E. Coli* с магнитным полем с частотой 50 Гц медиана. 1. – Наночастицы (Ni+Fe) $3O_4$. 2. – Наночастицы (Zn+Fe) $3O_4$. 3. – Наночастицы (Co+Fe) $3O_4$. 4. – Положительный контроль (бактерии без воздействия).

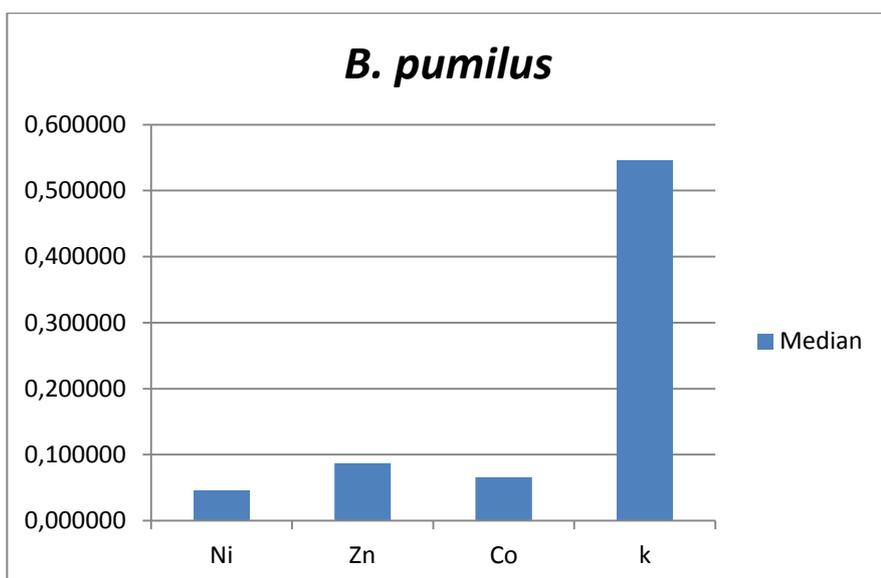


Рисунок 48 – Диаграмма сравнения биопленок грамположительных бактерий *Bacillus pumilus* контроль без магнитного поля медиана. 1. – Наночастицы (Ni+Fe) $3O_4$. 2. – Наночастицы (Zn+Fe) $3O_4$. 3. – Наночастицы (Co+Fe) $3O_4$. 4. – Положительный контроль (бактерии без воздействия).

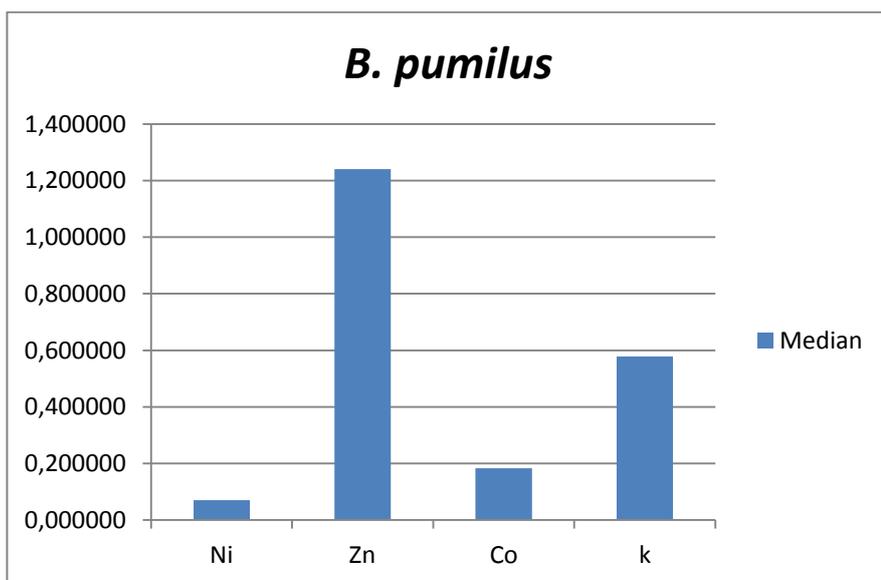


Рисунок 49 – Диаграмма сравнения биопленок грамположительных бактерий *Bacillus pumilus* с магнитным полем с частотой 50 Гц медиана. 1. – Наночастицы (Ni+Fe) $3O_4$. 2. – Наночастицы (Zn+Fe) $3O_4$. 3. – Наночастицы (Co+Fe) $3O_4$. 4. – Положительный контроль (бактерии без воздействия).

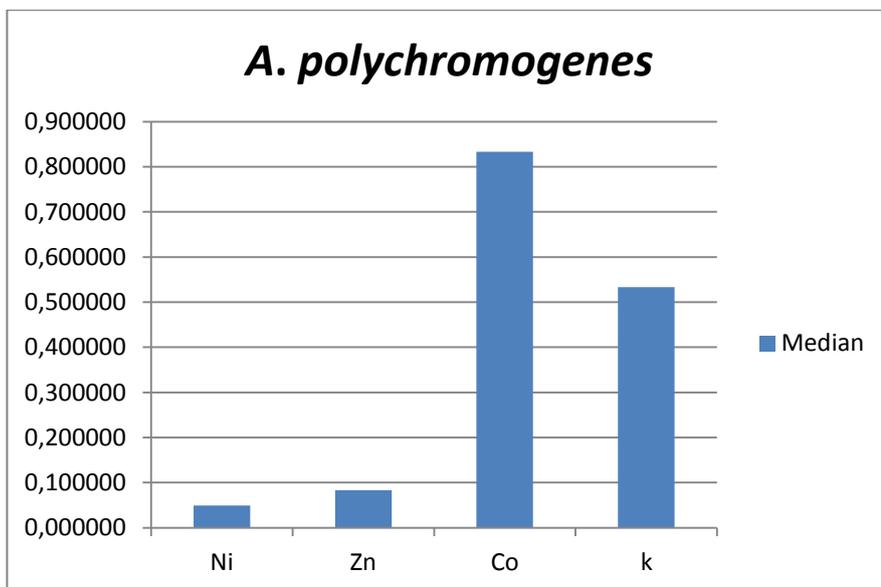


Рисунок 50 – Диаграмма сравнения биопленок грамположительных бактерий *Arthrobacter polychromogenes* контроль без магнитного поля медиана. 1. – Наночастицы $(\text{Ni}+\text{Fe})\text{ЗO}_4$. 2. – Наночастицы $(\text{Zn}+\text{Fe})\text{ЗO}_4$. 3. – Наночастицы $(\text{Co}+\text{Fe})\text{ЗO}_4$. 4. – Положительный контроль (бактерии без воздействия).

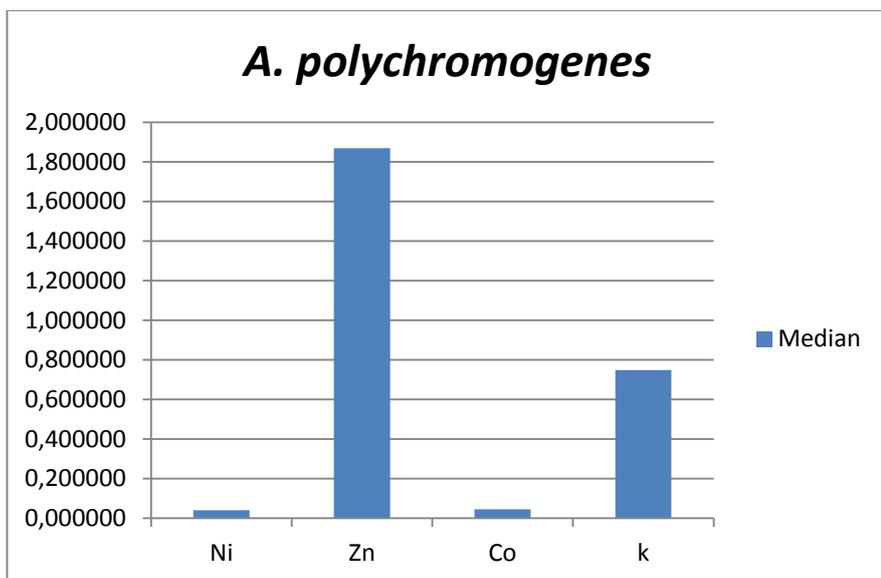


Рисунок 51 – Диаграмма сравнения биопленок грамположительных бактерий *Arthrobacter polychromogenes* с магнитным полем с частотой 50 Гц медиана. 1. – Наночастицы $(\text{Ni}+\text{Fe})\text{ЗO}_4$. 2. – Наночастицы $(\text{Zn}+\text{Fe})\text{ЗO}_4$. 3. – Наночастицы $(\text{Co}+\text{Fe})\text{ЗO}_4$. 4. – Положительный контроль (бактерии без воздействия).

4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Получена серия наночастиц на основе железа, с покрытием полисахаридами хитозан и арабиногалактан, нагрузкой антибиотиком Амоксиклав в трех концентрациях (3, 10, 20 мкг/мл), легированных ионами металлов с потенциальными антибактериальными свойствами – никелем, кобальтом и цинком.
2. Проведена оценка антибактериальной активности полученных наночастиц. Показано, что частицы на основе Fe нетоксичны для бактерий, абсорбция антибактериального препарата на полученных наночастицах подавляла рост бактерий, но не значительно.
3. Разработанные магнитные наночастицы, легированные Zn, Co и Ni, оказывали антибактериальный эффект в жидких и на твердых питательных средах, при воздействии переменного магнитного поля и без него.
4. Показано, что воздействие магнитных наночастиц, в том числе легированных металлами, в магнитном поле снижало формирование биопленки у грамотрицательных и грамположительных бактерий *E. coli*, *B. pumilus*, *A. polychromogenes*.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Jing Yan. Surviving as a Community: Antibiotic Tolerance and Persistence in Bacterial Biofilms / Yan Jing. [et al.] // Cell Host & Microbe.– 2019. – doi: 10.1016/j.chom.2019.06.002
2. Зиганшин, А.У. Наночастицы: фармакологические надежды и токсикологические проблемы. / А.У. Зиганшин, Л.Е. Зиганшина // Казанский медицинский журнал.-2008.-Т.89,вып.1.-с.15-18
3. Долматов, В.Ю. Детонационные наноалмазы: синтез, строение, свойства, применение / В.Ю. Долматов // Успехи химии.- 2007.- №76.-с.4.
4. Clay Fuqua. Biofilms 2018: a Diversity of Microbes and Mechanisms / Clay Fuqua. [et al.] // Journal of Bacteriology.– 2018. – doi: 10.1128/JB.00118-19
5. F.J. La'zaroa. Magnetic characterisation of rat muscle tissues after subcutaneous iron dextran injection / La'zaroa F.J. [et al.] // Biochimica et Biophysica Acta.-2005.-№1740434 .-p.445
6. Rosenberger Ina. Physico-chemical and toxicological characterization of iron-containing 2 albumin nanoparticles as platforms for medical imaging / Ina Rosenberger [et al.] // Journal of Controlled Release.-2014.- p.1-8.
7. Pushkar Kulkarni. Magnetic nanoparticle formulation for targeted delivery of chemotherapeutic irinotecan to lungs / Pushkar Kulkarni [et al.] // Drug Delivery and Translational Research.-2018.-№10.-p.24-34.
8. Subhankar, B. Supermagnetism / B Subhankar [et al.] // J. Phys. - 2009. – №42. – p. 013001.
9. Wen Yin. Biofilms: The Microbial “Protective Clothing” in Extreme Environments / Yin Wen. [et al.] // International Journal of Molecular Sciences.-2019.-№ 20.-p. 3423.
10. C. J. Frapwell. Antimicrobial Activity of the Quinoline Derivative HT61 against Staphylococcus aureus Biofilms / Frapwell C. J. [et al.] // Antimicrobial Agents and Chemotherapy.-2020.-№ 64.-p. e02073-19.

11. Мальцев С.В. Что такое биопленка? / С.В. Мальцев [и др.] // Практическая медицина.-2011.- №5.-стр7-10.
12. Mahsa Tarantash. Preparation, characterization and in vitro anticancer activity of paclitaxel conjugated magnetic nanoparticles / Mahsa Tarantash [et al.] // Drug Development and Industrial Pharmacy.-0363-9045.-p.1520-5762.
13. Syed Mohd Danish Rizvia. Gold nanoparticles: A plausible tool to combat neurological bacterial infections in humans / Syed Mohd Danish Rizvia [et al.] // Biomedicine & Pharmacotherapy.-2018.-№107.-p.7-18.
14. Lewis JB. Seidman DN.C12/C13-ratio determination in nanodiamonds by atom-probe tomography / JB Lewis [et al.] // Ultramicroscopy.-2015.-№159.-p.248-54.
15. Yuyan Jiang. Multimodal Biophotonics of Semiconducting Polymer Nanoparticles / Yuyan Jiang and Kanyi Pu // Account of chemical research.-2018.-№10.-p.102.
16. Wen Jen Lin. Polysaccharide-modified nanoparticles with intelligent CD44 receptor targeting ability for gene delivery / Wen Jen Lin, Wei Chi Lee // International Journal of Nanomedicine.-2018.-№13.-p.3989–4002.
17. Jiakuan Sun. Aqueous latex/ceramic nanoparticle dispersions: colloidal stability and coating properties / Jiakuan Sun [et al.] // Journal of Colloid and Interface Science.-2004.-№280.-p.387–399.
18. Agnieszka Skoczeń. Low Doses of Polyethylene Glycol Coated Iron Oxide Nanoparticles Cause Significant Elemental Changes Within the Main Organs / Agnieszka Skoczeń [et al.] // Chemical research in toxicology.-2018.-№10.-p.1021.
19. M.Abd Elgadir. Impact of chitosan composites and chitosan nanoparticle composites on various drug delivery systems: A review / M.Abd Elgadir [et al.] // Journal of food and drug analysis.-2014.-№10.-p.8.
20. Sangiliyandi Gurunathan. Cytotoxic Potential and Molecular Pathway Analysis of Silver Nanoparticles in Human Colon Cancer Cells HCT116 /

- Sangiliyandi Gurunathan [et al.] // Internatoinal journals of Molecular Science.-2018.-№19.-p.2269.
21. M. Darvish Ganji. First-principles and Molecular Dynamics simulation studies of functionalization of Au₃₂ golden fullerene with amino acids / M. Darvish Ganji [et al.] // Scientific Reports.-2018.-№8.-p.11400.
 22. José Cobeña-Reyes. Complex Behavior of Ordered and Icelike Water in Carbon Nanotubes Near the Bulk Boiling Point / José Cobeña-Reyes [et al.] // The Journal of Physical Chemistry Letters.-2018.-№10.-p.1021.
 23. Oscar D. Petrucci. A Ferritin Photochemical Synthesis of Monodispersed Silver Nanoparticles That Possess Antimicrobial Properties / Petrucci Oscar D. [et al.] // Journal of Nanomaterials.-2019.-
<https://doi.org/10.1155/2019/9535708>.
 24. Alexander M. Demin. Immobilization of a pH-low insertion peptide onto SiO₂/aminosilane-coated magnetite nanoparticles / M. Demin Alexander [et al.] // Mendeleev Communications.-2019.-№29.-p.631-634.
 25. J. C. Ried. Colloidal dispersions of oxide nanoparticles in ionic liquids: elucidating the key parameters† / Ried J. C. [et al.] // Journal Name.-2019.-№13.-p.1-13.
 26. Kecheng Quan. Possibilities and impossibilities of magnetic nanoparticle use in the control of infectious biofilms / Quan Kecheng. [et al.] // Journal of Materials Science & Technology.-2021.-№ 69.-p. 69-78.
 27. Yael N. Slavin. Metal nanoparticles: understanding the mechanisms behind antibacterial activity / Slavin Yael N. [et al.] // Journal of Nanobiotechnology.-2017.-№65 .- DOI 10.1186/s12951-017-0308-z.
 28. C. Bankier. Synergistic Antibacterial Effects of Metallic Nanoparticle Combinations / Bankier C. [et al.] Scientific Reports.-2019.-№9.-p. 16074.- DOI 10.1186/s12951-017-0308-z.
 29. Usama H Abo-Shama. Synergistic and Antagonistic Effects of Metal Nanoparticles in Combination with Antibiotics Against Some Reference

- Strains of Pathogenic Microorganisms / H Abo-Shama Usama [et al.]
Infection and Drug Resistance.-2020.-№12.-p. 351- 362.
30. Muhammad Arif Asghar. Synergistic Nanocomposites of Different Antibiotics Coupled with Green Synthesized Chitosan-Based Silver Nanoparticles: Characterization, Antibacterial, in vivo Toxicological and Biodistribution Studies / Arif Asghar Muhammad [et al.] // Int J Nanomedicine.-2020.-№15.-p. 7841–7859.
 31. Connie Walden. Biofilms Versus Activated Sludge: Considerations in Metal and Metal Oxide Nanoparticle Removal from Wastewater / Walden Connie. [et al.] // Environ Sci Technol.-2016.-DOI: 10.1021/acs.est.6b01282.
 32. Said M. Daboor. Disruption of the extracellular polymeric network of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by alginate lyase enhances pathogen eradication by antibiotics / M. Daboor Said. [et al.] // Journal of Cystic Fibrosis.-2021.- <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2020.04.006>.
 33. Aviwe Magadla. Enhanced photodynamic antimicrobial activity of surface modified SiNPs doped with zinc(II) phthalocyanines: The effect of antimicrobial ampicillin and extra charges from a sultone / Magadla Aviwe. [et al.] // Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.-2020.- № 32.-p. 101-996.
 34. Dobretsov K. G. A Method for Introduction of Magnetic Nanoparticles into Tissues by Means of Magnetic Field Gradient: An Experimental Study / K. G. Dobretsov [et al.] // Eksperimental'noi Biologii i Meditsiny.-2009.-№6.-pp. 693-695.
 35. R. K. Gilchrist, R. Medal, W. D. Shorey. Selective inductive heating of lymph nodes / Gilchrist R. K. [et al.] // Ann Surg. – 1957. – Vol. 79. – P. 596–606.
 36. K. Maier-Hauff. Intracranial thermotherapy using magnetic nanoparticles combined with external beam radiotherapy: Results of a feasibility study on patients with glioblastomamultiforme / Maier-Hauff K. [et al.] // J. Neuro-Oncology. – 2007. – Vol.81. – P.53–60.

37. M. D. Falkenhagen. Small particles in medicine / Falkenhagen M. D. // *Artif Organs*. -1995. – Vol.19. - P. 792– 794.
38. A. M. Morawski, G. M. Lanza, S. A. Wickline. Targeted nanoparticles for quantitative imaging of sparse molecular epitopes with MRI / Morawski A. M. [et al.] // *Magn. Reson. Med.*– 2004. – Vol. 51. – P. 480–486.
39. Пахомова, В.Г. Изменение генерации активных форм кислорода в печени после введения биогенного ферригидрита / В.Г Пахомова [и др.] // *Здоровье. Мед. экология*. Н.-№3.- 2017.-р.70.
40. Шевелёв, Д.И. Влияние биогенных наночастиц ферригидрита на всхожесть семян и биометрические показатели проростков овса / Д.И Шевелёв [и др.] // *Успехи современной науки*.-2017.-Том 5.-№2.
41. Столяр, С.В., Баяков О.А., Гуревич Ю.Л. Железосодержащие наночастицы, образующиеся в результате жизнедеятельности микроорганизмов / С.В. Столяр [и др.] // *Неорганические материалы*.- 2006.- Т.42. -№7.-С.843-848.
42. Mehrdad Samadishadlou. Magnetic carbon nanotubes: preparation, physical properties, and applications in biomedicine / Mehrdad Samadishadlou // <http://dx.doi.org/10.1080/21691401.2017.1389746>.
43. Arbab Ali. Review on Recent Progress in Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Diverse Applications / Arbab Ali // <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.629054>.
44. Innocent Nkurikiyimfura. Temperature-dependent magnetic properties of magnetite nanoparticles synthesized via coprecipitation method / Innocent Nkurikiyimfura. [et al.] // *Journal of Alloys and Compounds*.-2020.-№ 846.- p. 156344.
45. Mengxia Wang. Immobilization of mercury by iron sulfide nanoparticles alters mercury speciation and microbial methylation in contaminated groundwater / Wang Mengxia. [et al.] // *Chemical Engineering Journal*.- 2020.-№ 381.-p. 122664.

46. U. Klekotka. Layered magnetite nanoparticles modification –synthesis, structure, and magnetic characterization / Klekotka U. [et al.] // *Arabian Journal of Chemistry*.-2017.- <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.11.002>.
47. Е. В. Арискин. Реагирующие на магнитное поле включения в клетках прокариот / Арискин Е. В. // *Микробиология*. - 2003. - т.72. №3. - С.293-300.
48. Губин, С. П. Магнитные наночастицы: методы получения, строение и свойства / С. П. Губин [и др.] // *Успехи химии*. - 2005. – т.6.-№74. - С.549- 569.
49. Киршвинка Д. Биогенный магнетит и магниторецепция: Новое о биомagnetизме / Д. Киршвинка [и др.] // *Мир*. - 1989.- т.1. - 352 с.
50. Верховцева, Н. В. Образование бактериями магнетита и магнитотаксис / Н. В. Верховцева [и др.] // *Успехи микробиологии*. - 1992. - т. 25. - С. 51-79.
51. Верховцева, Н. В. Трансформация соединений железа гетеротрофными бактериями / Н. В. Верховцева // *Микробиология*. - 1995. - т. 64. № 4. - С. 473-478.
52. Bazyliniski, D. A., Frankel, R. B. Magnetosome formation in prokaryotes./ D. A. Bazyliniski, R. B Frankel // *Nature Rev.* - 2004. - №2 - P. 217-230.
53. Kannan Badri Narayanan, Natarajan Sakthivel. Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes / Narayanan Kannan Badri, Sakthivel Natarajan // *Advances in Colloid and Interface Science*. - 2010. - №156. - P. 1–13.
54. Takada Jun. Novel microorganism capable of producing oxide / Jun Takada [et al.] // Patent № WO2011074586.
55. Ito A., Shinkai M., Honda H. et al. Medical application of functionalized magnetic nanoparticles / Ito A [et al.] // *Journal of Bioscience and Bioengineering*. -2005.- Vol.100.- №1.- P. 1-11.
56. Михайлов Г.А., Васильева О.С. Технологии будущего: использование магнитных наночастиц в онкологии / Г.А. Михайлов [и др.] // *Бюллетень СО РАМН*.- 2008. -№3. -С. 18-22 62.

57. Rinaldi C., Latorre M. Applications of Magnetic Nanoparticles in Medicine: Magnetic Fluid Hyperthermia / C Rinaldi [et al.] // Puerto Rico Health Sciences Journal. -2009.- Vol. 28.- №3. -P.227-238.
58. Столяр, С.В, Баяуков О.А., Ладыгина В.П.. Мессбауэровское исследование температурных превращений в бактериальном ферригидрите / С.В. Столяр [и др.] // Физика твердого тела. -2011. - Т.52.- №1. -С.97-101.
59. Ishchenko, L.A., Stolyar S.V., Ladygina V. P. Magnetic properties and application of biomineral particles produced by bacterial culture / L.A. Ishchenko [et al.] // Physics Procedia.- 2010.-№9. -P.280-282.
60. S. V Stolyar, L.A. Chekanova, R.N. Yaroslavtsev, S. V Komogortsev, Y. V Gerasimova, O.A. Bayukov, M.N. Volochaev, R.S. Iskhakov, I. V Garanzha, O.S. Kolovskaya, M.S. Bairmani, T.N. Zamay, Magnetic nanoconstructions of iron oxides coated with arabinogalactan functionalized with DNA aptamer, J. Phys. Conf. Ser. 1399 (2019) 22026.
61. S. V. Stolyar, O.A. Bayukov, L.A. Chekanova, Y. V. Gerasimova, A.E. Sokolov, R.S. Iskhakov, R.N. Yaroslavtsev, M.N. Volochaev, A.S. Artemyeva, E. V. Cheremiskina, Y. V. Knyazev, Anisometric Iron Oxide-Based Nanoparticles and Sols Based on Them: Preparation and Properties, J. Supercond. Nov. Magn. 32 (2019) 971–975.
62. S. V. Stolyar, S. V. Komogortsev, L.A. Chekanova, R.N. Yaroslavtsev, O.A. Bayukov, D.A. Velikanov, M.N. Volochaev, E. V. Cheremiskina, M.S. Bairmani, P.E. Eroshenko, R.S. Iskhakov, Magnetite Nanocrystals with a High Magnetic Anisotropy Constant due to the Particle Shape, Tech. Phys. Lett. 45 (2019) 878–881.
63. Baldi F, Marchetto D, Paganelli S, Piccolo O. Bio-generated metal binding polysaccharides as catalysts for synthetic applications and organic pollutant transformations. New Biotechnology. 2011; 29(1):74–8.
64. Ebrahiminezhad A., Manafi Z., Berenjian A., Kianpour S., Ghasemi Y. Review Paper: Iron-Reducing Bacteria and Iron Nanostructures // Journal of

Advanced Medical Sciences and Applied Technologies – 2017 – Vol. 3, № 1.
– P. 9-15.

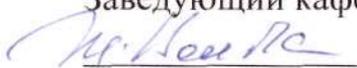
65. Ю.Л. Райхер, В.И. Степанов, С.В. Столяр, В.П. Ладыгина, Д.А. Балаев, Л.А. Ищенко, М. Балашою. Магнитные свойства биоминеральных наночастиц, продуцируемых бактериями *Klebsiella oxytoca* // Физика твердого тела, 2010, том 52, вып. 2; с. 277-284.
66. С. В. Столяр, О. А. Баяюков, Ю. Л. Гуревич, Е. А. Денисова, Р. С. Исхаков, В.П. Ладыгина, А.П. Пузырь, П.П. Пустошилов, М.А. Битехтина. Железосодержащие наночастицы, образующиеся в результате жизнедеятельности микроорганизмов// Неорганические материалы. - 2006. - т. 42., № 7. - С. 1-6.
67. Cavallo S., Mei G., Stefanini S., Rosato N., Finazzi-Agro A., Chiancone E. // Protein/ Sci. 1998. Vol. 7. P. 427-432.
68. Shih-Hung Huang. Biochemical and biomedical applications of multifunctional magnetic nanoparticles: a review / Shih-Hung Huang. [et al.] // J Nanopart Res.-2011.-№13.-p.4411–4430.
69. Lina Kafrouni1. Recent progress on magnetic nanoparticles for magnetic hyperthermia / Kafrouni1Lina [et al.] // Prog Biomater.-2016.-№5.-p.147–160.
70. Mohamed M. Fathy. Silica-coated iron oxide nanoparticles as a novel nano-radiosensitizer for electron therapy / Mohamed M. Fathy. [et al.] // Life Sciences.- 2019.-№ 234 .-p.116756.
71. Edouard Alphantery. Biodistribution and targeting properties of iron oxide nanoparticles for treatments of cancer and iron anemia disease / Edouard Alphantery [et al.] // Nanotoxicology.-2019. doi:10.1080/17435390.2019.1572809.
72. Berman S.M.C., Walczak P., Bulte J.W.M. Tracking stem cells using magnetic nanoparticles / S.M.C Berman [et al.] // Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology.- 2011.- Vol. 3. -№4. - P.341–437.

73. Singh J.P. Enabling technologies for homing and engraftment of cells for therapeutic applications / J.P. Singh // Journal of the American College of Cardiology.- 2009.-№2. -P.803-804.
74. Kyrtatos P.G, Lehtolainen P., Junemann-Ramirez M. Magnetic Tagging Increases Delivery of Circulating Progenitors in Vascular Injury / P.G. Kyrtatos [et al.] // JACC: Cardiovascular Interventions.- 2009. -№8. -P.794-802.
75. Хауссер К.Х., Кальбитцер Х.Р. ЯМР в медицине и биологии:структура молекул, томография, спектроскопия in vivo / К.Х. Хауссер [и др.] // Киев: Наукова думка.- 1993.- с. 258.
76. Блюмих Б. Мир физики и техники. Основы ЯМР. Москва:Техносфера.2007.148 с.

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

 Т.Г. Волова

«24» июня 2022 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Оценка эффективности магнитных наноконплексов в качестве
систем контролируемой доставки антибиотиков

06.04.01 Биология

06.04.01.01 Микробиология и биотехнология

Научный руководитель



подпись, дата

22.06.22

к. биол. наук, доцент

должность, ученая степень

Н. О. Жила

инициалы, фамилия

Выпускник



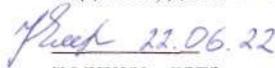
подпись, дата

22.06.22

М. В. Лошкарева

инициалы, фамилия

Рецензент



подпись, дата

22.06.22

к. биол. наук, науч.

сотр.

Е. Д. Николаева

инициалы, фамилия

Красноярск 2022