

на правах рукописи

Радциг Марина Александровна

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ КЛЕТОК БАКТЕРИЙ С СОЕДИНЕНИЯМИ СЕРЕБРА И
ЗОЛОТА: ВЛИЯНИЕ НА РОСТ, ОБРАЗОВАНИЕ БИОПЛЕНОК, МЕХАНИЗМЫ
ДЕЙСТВИЯ, БИОГЕНЕЗ НАНОЧАСТИЦ**

03.01.06 - Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва, 2013 г.

Работа выполнена в Лаборатории регуляции экспрессии генов микроорганизмов
Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной
генетики Российской академии наук.

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Хмель Инесса Александровна

Научный консультант: доктор химических наук
Надточенко Виктор Андреевич

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
Манухов Илья Владимирович
ФГУП Государственный научно-исследовательский
институт генетики и селекции промышленных
микроорганизмов («ГосНИИгенетика»),
ведущий научный сотрудник

кандидат биологических наук
Зарубина Алевтина Петровна
ФГБОУ ВПО Московский государственный университет
имени М.В.Ломоносова,
старший научный сотрудник

Ведущая организация: Государственное учреждение Научно-исследовательский
институт эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф.Гамалеи
Российской академии медицинских наук.

Защита состоится 19 февраля 2013 г. в 15:30 на заседании диссертационного совета
Д.501.001. 21 при Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова по
адресу: 119992, Москва, Ленинские горы, дом 1, МГУ, корп.12, Биологический факультет,
ауд. М-1.

Тел: 8(495)939-54-83, эл. почта: npiskunkova@rambler.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Биологического факультета МГУ.

Автореферат разослан «__» _____ 2012 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Пискункова Н.Ф.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

В последние годы все увеличивающееся внимание исследователей привлекают вопросы, связанные с биомедицинским использованием наночастиц металлов. Это объясняется, прежде всего, насущной необходимостью разработки принципиально новых лекарственных препаратов против инфекций микроорганизмов, что обусловлено широким распространением форм патогенных бактерий – возбудителей различных острых и хронических инфекций, устойчивых к антибиотикам и другим антибактериальным средствам. Кроме того, существенные перспективы может дать в будущем применение лекарственных средств на основе наноматериалов в онкологии и многих других важных областях медицины. Основой этого послужили значимые успехи, достигнутые в разработке методов получения наночастиц металлов различной формы и размера, нанокompозитов и покрытий устройств медицинского назначения. Активно проводятся исследования перспектив использования наночастиц (НЧ) с адресной доставкой лекарств для антираковой терапии, конструируемых на основе магнитных наночастиц и наночастиц золота, активируемых светом, что обуславливает их фототермальный эффект.

Наиболее изученными и используемыми в биомедицинских исследованиях являются наноматериалы на основе серебра. Соединения серебра проявляют высокую токсичность по отношению к широкому ряду микроорганизмов, и в силу этого они эффективно применяются в медицине против разнообразных инфекций, в том числе в виде наночастиц, покрытий различных имплантируемых устройств, дезинфицирующих фильтров и т.п. Несмотря на то, что бактерицидные свойства соединений серебра хорошо известны и давно используются человеком, биохимические механизмы их действия изучены лишь частично.

В настоящее время развернут широкий фронт исследований наночастиц металлов и полупроводников, их действия на микроорганизмы и другие живые клетки, а также перспектив их использования в биомедицине.

Большую проблему для медицины представляет способность патогенных бактерий формировать биопленки – сообщества бактерий, прикрепленные к различным поверхностям и окруженные матриксом, состоящим из внеклеточных полисахаридов, белков, нуклеиновых кислот и др. Устойчивость бактерий, обитающих в биопленках, к лекарственным препаратам многократно повышена по сравнению с планктонно

растущими бактериями. К настоящему времени действие НЧС на биопленки исследовано крайне мало.

Кроме изучения свойств и использования наноматериалов, исследования многих авторов направлены на разработку биологических подходов к синтезу НЧ различных металлов. Изучение биогенеза НЧ с помощью экстрактов растений, грибов, дрожжей, водорослей, бактерий становится все более важным, поскольку такой процесс их получения дает высокий процент выхода готовых НЧ, практически нетоксичен, экономически выгоден, позволяет контролировать их размер и форму. Следует отметить, что перечисленные биологические объекты используются в биосинтезе НЧ как для восстановления ионов металлов до наночастиц, так и для стабилизации образующихся частиц за счет продуцируемых белков, полисахаридов, липидов клеточной стенки и т.д.

Данная работа посвящена изучению действия ионов и наночастиц серебра и золота на бактериальный рост, образование биопленок и разрушение зрелых биопленок. Получены данные о некоторых аспектах механизмов действия соединений серебра и золота на клетки. Кроме того, проведены исследования, направленные на получение наночастиц металлов биологическим способом с использованием различных штаммов цианобактерий и *Azotobacter*. Разработан метод оптоперфорации клеточной стенки цианобактерий в присутствии наночастиц золота. Этот метод был использован для разрушения бактериальных клеток и биопленок наночастицами золота, облученными лазерным импульсом ближнего ИК диапазона.

Цели и поставленные задачи

Целью работы было сравнительное исследование антибактериальных эффектов ионов и наночастиц серебра и золота, изучение некоторых аспектов механизма их действия и разработка методов получения наночастиц золота с помощью бактерий.

Конкретными задачами работы были:

- изучение влияния ионов и наночастиц серебра (НЧС) и золота (НЧЗ) на рост бактерий, формирование и деградацию биопленок;
- изучение чувствительности к ионам серебра, золота и НЧС клеток *E. coli* с мутациями в генах, участвующих в репарации ДНК, с целью выяснения роли разных типов репарации ДНК в защите клеток при действии этих соединений;
- определение роли транспортных белков поринов в антибактериальном действии соединений серебра и золота;

- исследование влияния ионов и наночастиц серебра и золота на клетки бактерий, дефектные по глобальным регуляторам экспрессии генов;
- разработка метода и изучение оптоперфорации стенки цианобактерий и биопленок в присутствии НЧЗ;
- разработка методов получения НЧ металлов биологическим способом с использованием бактерий.

Научная новизна и практическая ценность работы

Определены концентрационные закономерности ингибирующего действия ионов серебра, золота и НЧС на рост и формирование биопленок грамотрицательными бактериями. Показано, что эти соединения вызывают деградацию зрелых биопленок *Escherichia coli* и гибель клеток в них в концентрациях значительно более высоких, чем те, которые подавляют планктонный рост бактерий и формирование биопленок. В работе были исследованы механизмы повышенной резистентности биопленок *E. coli* к действию НЧС и ионов серебра и золота.

Проведены исследования некоторых аспектов механизмов действия соединений серебра и золота на бактериальные клетки. Впервые показано, что мутации в генах, ответственных за репарацию окислительных повреждений ДНК (*mutY*, *mutS*, *mutM*, *mutT*, *nth*), увеличивали чувствительность клеток *E. coli* к ионам серебра и НЧС; повидимому, эти гены вовлечены в восстановление окислительных повреждений ДНК, связанных с действием соединений серебра. Однако, мы не обнаружили подобных эффектов при действии ионов золота. Полученные результаты показывают, что механизмы бактерицидного действия ионов золота и соединений серебра (ионов и НЧС) на бактериальные клетки существенно различаются.

Не наблюдалось различий в чувствительности к ионам серебра, золота и НЧС у штаммов *E. coli* дикого типа и штаммов, дефектных по эксцизионной репарации (*uvrA*, *uvrB* мутанты), SOS-репарации и рекомбинации (*recA*, *lexA*, *recBC*, *umuC* и *umuD* мутанты). Это показывает, что чувствительность бактерий к соединениям серебра и золота не связана с повреждениями ДНК, которые могут быть восстановлены при участии этих систем. Не обнаружено значительных различий в чувствительности штаммов, дефектных по сигме S субъединице РНК-полимеразы и Quorum Sensing регуляции, т.е. эти глобальные регуляторы не играют существенной роли в контроле чувствительности/устойчивости к исследуемым веществам.

Впервые показано, что мутантные штаммы *E. coli*, лишенные белков поринов OmpF или OmpC, были существенно более устойчивыми к НЧС по сравнению со

штаммом дикого типа. Поры, образуемые поринами OmpF и OmpC, имеют размер 1 – 1,1 нм, поэтому через них могут проходить ионы серебра, выделяемые наночастицами, но не исследованные НЧС ($8,3 \pm 1,9$ нм). Эти данные свидетельствуют о том, что антибактериальное действие НЧС на клетки *E. coli* связано, главным образом, с проникновением ионов серебра через клеточную стенку.

Полученные в данной работе результаты расширяют наши представления о механизмах действия соединений серебра и золота на бактериальные клетки.

Разработан метод оптоперфорации фемтосекундными (~ 100 фс) лазерными импульсами ближнего ИК диапазона клеточной стенки цианобактерий и биопленок *E. coli* в присутствии НЧЗ. Показано, что наночастицы золота за счет плазмонного резонанса понижают порог оптоперфорации, и при этом формируются субмикронные отверстия в стенке бактерий и биопленках.

Проведены эксперименты по получению наночастиц металлов с помощью бактерий. Получены стабильные НЧЗ при культивировании цианобактерий и *Azotobacter* в среде, содержащей соль золота. Была исследована возможность получения НЧ золота при варьировании условий культивирования.

Практическая значимость работы связана, прежде всего, с перспективностью использования наночастиц серебра и золота в качестве антибактериальных агентов. Полученные закономерности действия этих соединений на рост бактерий и биопленки могут быть полезны для разработки методов их применения в антибактериальной терапии и других областях их использования. Представляют интерес для практики также данные о получении стабильных НЧЗ биологическим методом, с помощью бактерий.

Апробация работы

Материалы диссертации были представлены на конференции «Физиология и генетика микроорганизмов в природных и экспериментальных системах», Москва (26-29 мая 2009 г.); I и II Международном конкурсе научных работ молодых ученых в области нанотехнологии, Москва (3-5 декабря 2008 и 6-8 октября 2009 г.); международной научной конференции по биоорганической химии, биотехнологии и бионанотехнологии, посвященной 75-летию со дня рождения академика Ю.А. Овчинникова, Москва-Пушино (28 сентября -1 октября 2009 г.); 3 Евразийском конгрессе по медицинской физике и инженерии «Медицинская физика – 2010», Москва (21-25 июня 2010 г.); 5 Всероссийской конференции молодых ученых «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой», Саратов (сентябрь, 2010 г.); XXIV Зимней молодежной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии»,

Москва (7-9 февраля 2012 г.); 7th European meeting on solar chemistry and photocatalysis: environmental applications, Porto, Portugal (17-20 июня 2012); II International Conference on Antimicrobial Research (ICAR2012), Lisbon, Portugal (21-23 ноября 2012); ежегодных отчетных научных конференциях ИМГ РАН (2009-2012 г.), а также регулярных семинарах Лаборатории регуляции экспрессии генов микроорганизмов ИМГ РАН.

Публикации

По теме работы опубликованы 4 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Структура и объем работы

Диссертационная работа состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, выводы. Работа изложена на _____ страницах машинописного текста, включая _____ таблиц, _____ рисунков. Список цитируемых литературных источников включает _____ работ.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Антимикробные свойства серебра известны очень давно. Ионы серебра проявляют широкий спектр действия, они подавляют рост патогенных бактерий, вирусов, грибов. Относительно механизма действия серебра на бактерии известно, что соединения серебра взаимодействуют с белками, различными ферментами, нуклеиновыми кислотами, вызывают структурные изменения клеточной стенки и мембран бактерий, ингибируют цепи переноса электронов клетки, что приводит в конечном итоге к разрушению и гибели бактерий. Однако, многие вопросы, связанные с действием НЧС и ионов на бактерии, в том числе, механизмы транспорта НЧС в бактериальную клетку, генетический контроль чувствительности и резистентности клеток бактерий к соединениям серебра изучены мало.

Возросший интерес к изучению соединений золота связан прежде всего с тем, что применение НЧС рассматривается перспективным для терапии рака. Это вызвано тем, что НЧС проявляют фотохимический и фототермальный эффект при различных видах облучения. Разрабатываются методы их адресной доставки, в том числе с присоединением к ним различных лекарственных препаратов.

Влияние ионов и наночастиц серебра и золота на рост бактерий

Объектом наших исследований были раствор ионов серебра AgNO_3 в воде и сферические наночастицы серебра (НЧС) размером $8,3 \pm 1,9$ нм, которые были стабилизированы пептидами, образующимися при щелочном гидролизе казеина. Массовая доля серебра в данном растворе составляла не менее 70%.

Для определения чувствительности к ионам и наночастицам серебра клеток *E. coli* K12, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Serratia proteamaculans* 94 проводилось измерение минимальных ингибирующих концентраций (МИК). Суммарные данные по значениям МИК НЧС и AgNO_3 для представителей различных грамотрицательных бактерий приведены в таблице 1. МИК измеряли в 96-луночных полистироловых планшетах, используя метод серийных двукратных разведений; каждая лунка содержала $\sim 1 \times 10^5$ клеток в мл в среде NB. Измерения проводили после инкубации бактерий в течение 24 часов при 30°C на 2550 Microplate Reader (Bio-Rad, США) при 600 нм.

Было показано, что МИК AgNO_3 для грамотрицательных штаммов бактерий дикого типа *Escherichia coli* K12 и *Serratia proteamaculans* 94 были в среднем 0,10 мкг/мл, для *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 и *P. chlororaphis* 449 – 0,20 - 0,30 мкг/мл AgNO_3 (таб.1).

Таблица 1. Минимальные ингибирующие концентрации НЧС и AgNO_3 у грамотрицательных бактерий.

Штаммы	МИК AgNO_3 мкг /мл	МИК (AgNO_3) [Ag^+] mM	МИК НЧС, мкг/мл	МИК (НЧС) [Ag^0] mM	МИК НЧС частиц/мл
<i>E. coli</i> AB1157	0,1±0,05	0,00059	0,5±0,25	0,0032	$1,1 \cdot 10^{11}$
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	0,3±0,011	0,0018	8,0±0,30	0,052	$1,8 \cdot 10^{12}$
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> 449	0,2±0,05	0,0012	8,0±0,20	0,052	$1,8 \cdot 10^{12}$
<i>Serratia proteamaculans</i> 94	0,1±0,15	0,00059	2,0±0,25	0,013	$4,5 \cdot 10^{11}$

* Величины МИК приведены по результатам 2-3 опытов, каждый опыт проводился в двух повторностях.

МИК НЧС для *E. coli* AB1157 была в пределах 0,5 мкг/мл, для представителей бактерий рода *Pseudomonos* – 8 мкг/мл и для *Serratia* – 2 мкг/мл. В пересчете на количество наночастиц в растворе минимальные ингибирующие концентрации НЧС колебались в районе $1,1 \cdot 10^{11} \div 1,8 \cdot 10^{12}$ частиц/мл. В таблице приведены также данные для

действующих аналитических концентраций атомов $[Ag^0]$, в случае НЧС, и ионов $[Ag^+]$, в случае $AgNO_3$. Можно видеть, что значения минимальных ингибирующих концентраций $AgNO_3$ были существенно ниже по сравнению с МИК НЧС.

Суммарные данные по значениям МИК для *E. coli* K12, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 и *Serratia proteamaculans* 94 при действии ионов золота приведены в таблице 2. МИК $HAuCl_4$ для *E.coli* AB1157 был в пределах 1,0 мкг/мл, для представителей бактерий рода *Pseudomonas* – 80 мкг/мл и для *Serratia* – 1,4 мкг/мл.

Таблица 2. Минимальные ингибирующие концентрации ионов золота у грамотрицательных бактерий.

Штаммы	МИК $HAuCl_4$, мкг/мл*
<i>Escherichia coli</i> AB1157	1,0±0,3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	80±10
<i>Serratia proteamaculans</i> 94	1,4±0,03
<i>Serratia proteamaculans</i> 94/pME6000	1,4±0,03
<i>Serratia proteamaculans</i> 94/pME6863	1,4±0,03

* Величины МИК приведены по результатам 2-3 опытов, каждый опыт проводился в двух повторностях.

Принято считать, что наночастицы золота инертны в отношении прокариотических и эукариотических клеток. Однако в последнее время появились данные о том, что НЧЗ оказывали антибактериальное действие (Chatterjee et al. 2011; Cui et al. 2012; Zhou et al. 2012) и действовали на клетки высших организмов (Li et al. 2010; Schaeublin et al. 2011).

В связи с этим представляло интерес изучить действие НЧЗ на бактериальные клетки более подробно.

Были исследованы образцы НЧЗ, диаметром 15 ± 2 нм, имеющими форму нанопалочек и стабилизированные различными способами, и нами не было обнаружено какого-либо влияния раствора НЧЗ на клетки. Один из исследуемых образцов проявлял антибактериальное действие, но при дальнейших исследованиях было показано, что подавляющее действие оказывает цетилтриметиламмонийбромид (СТАВ) – детергент, используемый при синтезе НЧЗ и одновременно служащий стабилизатором полученного раствора. Не исключено, что антибактериальное действие на клетки, отмеченное в указанных выше работах, оказывали не сами НЧЗ, а вещества-детергенты.

Действие ионов и наночастиц серебра на формирование биопленок бактерий

Более 99% бактерий существуют в природных экосистемах в виде специфически организованных, прикрепленных к твердым поверхностям биопленок. Биопленки имеют характерную архитектуру и заключены в экзополимерный матрикс. Существование патогенных бактерий в составе биопленок создает большие трудности для медицинской практики, т.к. при этом многократно повышается устойчивость бактерий к действию антибактериальных препаратов. Было показано, что введение соединений серебра в различные материалы препятствует бактериальному обрастанию (Chopra 2007). Однако, количественные данные о влиянии ионов серебра на формирование биопленок были получены только недавно для *P. aeruginosa* (Bjarnsholt et al. 2007). Мы исследовали действие AgNO_3 и НЧС, а также ионов золота на образование биопленок у *E. coli* AB1157, *P. aeruginosa* PAO1 и *S. proteamaculans* 94 (рис.1). Ночные культуры исследуемых штаммов бактерий разбавляли в 300-1000 раз в среде NB. Для измерения образования биопленок культуры выращивали в полистироловых планшетах 24 ч с перемешиванием на качалке при 30 °С, после чего определяли рост планктонных, т.е. неприкрепленных клеток, при 600 нм. Образование биопленок измеряли после удаления среды, окрашивания прикрепленных клеток красителем кристаллический фиолетовый. Краситель из биопленок экстрагировали 96% этанолом, оптическую плотность раствора измеряли при 600 нм. По интенсивности окраски судили об уровне образования биопленок.

У *E. coli* AB1157 (рис.1А) и *S. proteamaculans* 94 (рис.1С) наблюдалось резкое уменьшение планктонного роста и формирования биопленок при увеличении концентрации от 0,075-0,15 мкг/мл до 0,3 мкг/мл AgNO_3 (при последней концентрации биопленки отсутствовали). У *P. aeruginosa* PAO1 (рис.1В) уровень образования биопленок снижался при 0,3 мкг/мл AgNO_3 , и при концентрации AgNO_3 0,6 мкг/мл биопленки не образовывались. При этом величины планктонного роста и уровня образования биопленок снижались практически до нуля при одной и той же концентрации AgNO_3 у *E. coli* AB1157 и *S. proteamaculans* 94. У *P. aeruginosa* PAO1 при 0,3 мкг/мл AgNO_3 наблюдалось несколько большее снижение планктонного роста, чем уровня биопленок, при увеличении концентрации серебра вдвое оба показателя уменьшались до нуля.

На рис. 1D приведены данные для действия НЧС на клетки *E. coli* AB1157. Планктонный рост оставался неизменным при концентрации НЧС до 1 мкг/мл, при дальнейшем ее повышении происходило его постепенное снижение; при 5-10 мкг/мл планктонный рост практически не наблюдался. Процесс образования биопленок был

несколько менее чувствителен к действию НЧС - снижение уровня биопленок наблюдалось при концентрации НЧС выше 2 мкг/мл.

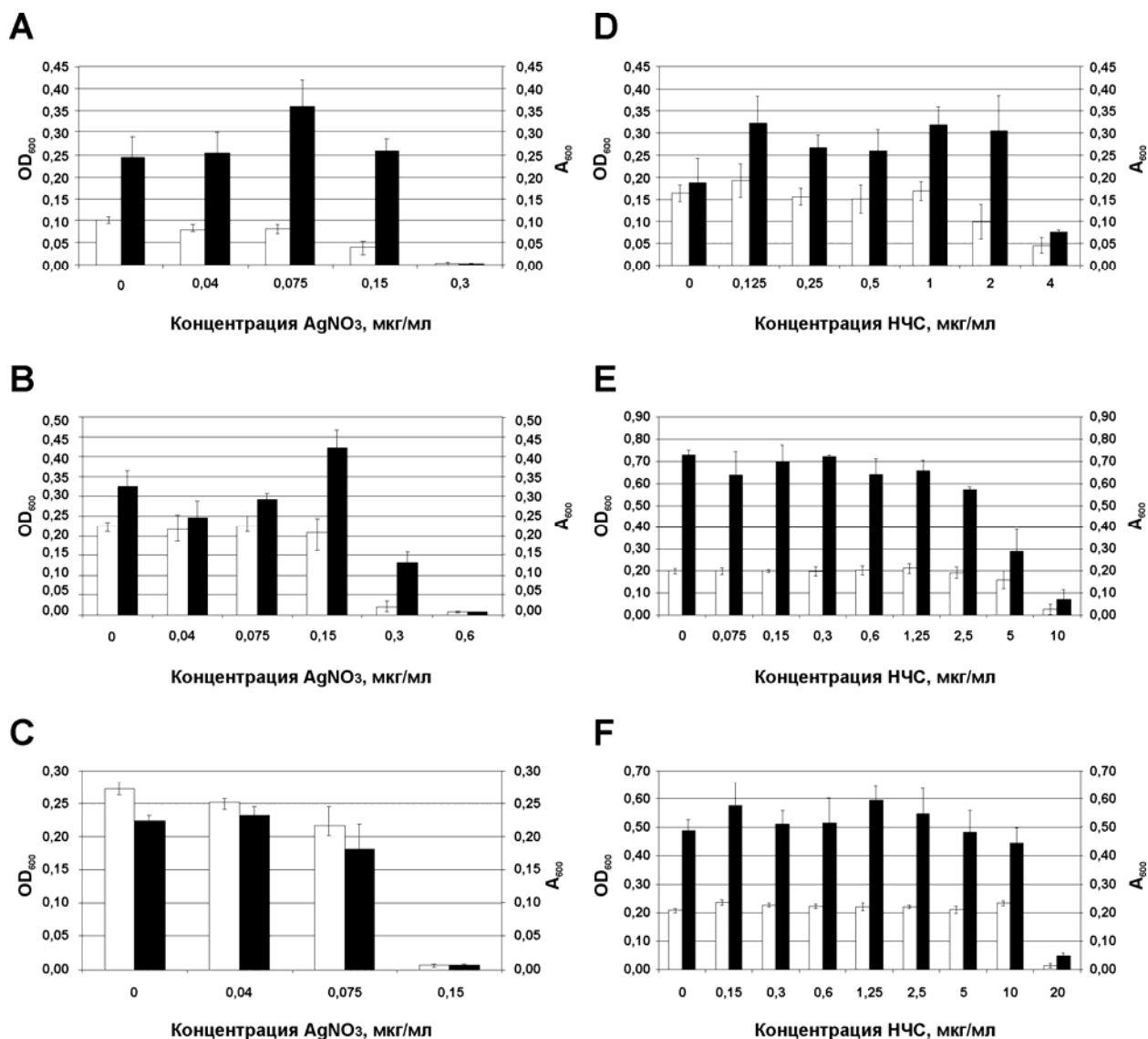


Рис. 1. Зависимость роста планктонных клеток (белые столбики) и образования биопленок (черные столбики) от различных концентраций AgNO₃ и НЧС.
 А: *E.coli* AB1157, В: *P. aeruginosa* PAO1, С: *S. proteamaculans* 94

При действии НЧС на *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (рис. 1Е) при концентрациях НЧС от 0 до 1,25-2,5 планктонный рост сохранялся на одном уровне, при концентрации НЧС выше 5 мкг/мл величина планктонного роста и уровень биопленок снижались, при 10-20 мкг/мл НЧС наблюдалось резкое падение обеих характеристик роста *P. aeruginosa* PAO1. В случае *Serratia proteamaculans* спад планктонного роста и уровня образования биопленок наблюдались при 10 мкг/мл НЧС; при 20 мкг/мл НЧС происходило резкое снижение этих показателей практически до нулевого уровня (рис. 1F).

Следует отметить, что концентрации AgNO_3 , подавляющие рост планктонных клеток и формирование биопленок, были значительно ниже, чем в случае действия НЧС. Практически одновременный спад планктонного роста и образования биопленок позволяет предполагать, что уменьшение формирования биопленок является следствием подавления роста бактерий в присутствии соединений серебра, а не связано со специфическим действием ионов и наночастиц серебра непосредственно на процесс образования биопленок.

В литературе практически не встречается данных о влиянии ионов золота на рост планктонных клеток и образование биопленок бактерий. В настоящей работе были выявлены количественные закономерности действия раствора тетрахлороаурата (III) водорода в воде (HAuCl_4) на образование биопленок у *E. coli* AB1157, *P. aeruginosa* PAO1 и *S. proteamaculans* 94 (рис. 2).

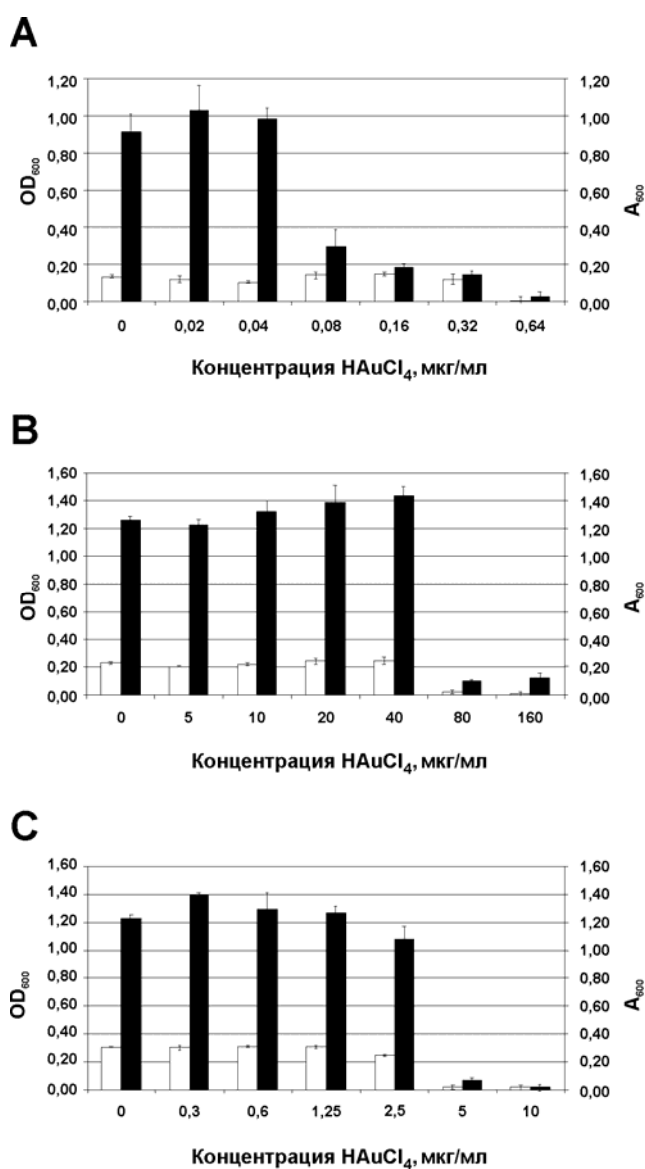


Рис. 2. Зависимость роста планктонных клеток (белые столбики) и образования биопленок (черные столбики) от различных концентраций Au^{3+} .

A: *E. coli* AB1157

B: *P. aeruginosa* PAO1

C: *S. proteamaculans* 94

На рис.2А приведены данные для *E. coli* AB1157. Планктонный рост и уровень образования биопленок оставались неизменными при концентрации HAuCl_4 до 0,08 мкг/мл.

При действии ионов золота на *P. aeruginosa* PAO1 (рис. 2В) при концентрации HAuCl_4 выше 40 мкг/мл величина планктонного роста и уровень биопленок резко снижались. В случае *S. proteamaculans* спад планктонного роста и уровня образования биопленок наблюдался при 2,5 мкг/мл HAuCl_4 ; при 5 мкг/мл ионов золота происходило резкое снижение этих показателей практически до нулевого уровня (рис. 2С).

Влияние НЧС и ионов золота на разрушение биопленок бактерий и гибель клеток в них

Как уже говорилось ранее, образование биопленок является одной из основных стратегий, повышающих выживаемость бактерий в окружающей среде, в том числе, в организме-хозяине. Клетки в составе сформированных биопленок являются крайне устойчивыми к действию антибиотиков и других лекарственных препаратов, в связи с этим представляло интерес исследовать действие НЧС и ионов золота на бактерии, живущие в уже образованных биопленках бактерий.

В качестве объекта изучения был выбран модельный штамм *E. coli* AB1157. Исследование проводили с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа (CLSM) Zeiss LSM 510 laser module при 100х увеличении с длиной волны возбуждающего лазера 488 нм; клетки окрашивали с использованием LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability and Counting Kit.

На рисунке 3 показаны результаты конфокальной лазерной сканирующей микроскопии биопленок бактерий *E. coli* AB1157 после обработки их НЧС.

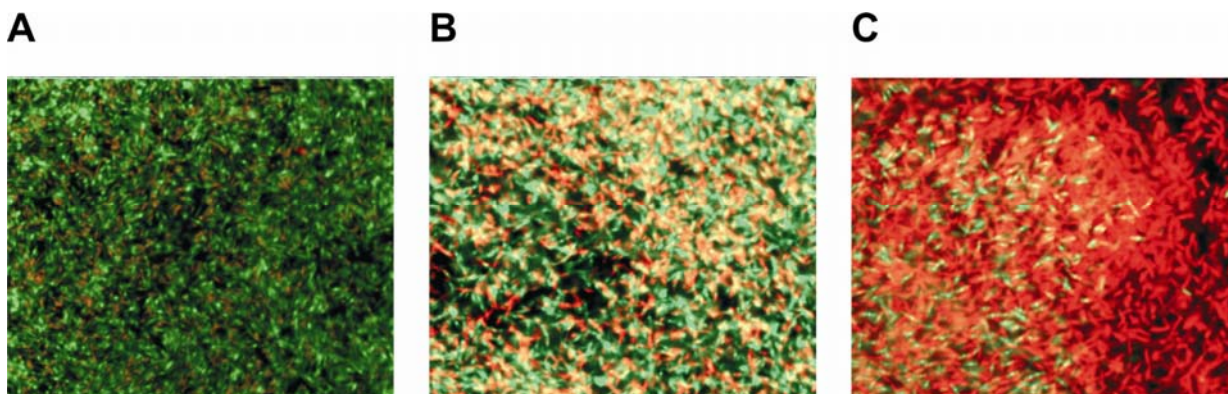


Рис. 3. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия биопленок бактерий *E. coli* AB1157 после обработки их НЧС: А- контроль, В- концентрация НЧС 50 мкг/мл, С- концентрация НЧС 150 мкг/мл.

На первом снимке показан контроль (био пленки в отсутствие НЧС), видно преобладание зеленого окрашивания, что свидетельствует о том, что большинство клеток живые. Рисунки В и С иллюстрируют нарастание интенсивности красного окрашивания с увеличением концентрации НЧС, что свидетельствует о гибели клеток в составе уже сформированных био пленок. Следует отметить, что гибель клеток, живущих в био пленках, наблюдается при более высоких концентрациях НЧС, чем подавление их образования. Бактериальные клетки в составе био пленок оказались до 25 раз более устойчивыми к действию НЧС размером 8,3 нм, чем планктонные клетки.

Параллельно проводили количественное измерение степени разрушения уже образованных био пленок при действии НЧС. Для этого выросшие на стеклах био пленки обрабатывали разными концентрациями НЧС, после чего стекла окрашивали кристалл-фиолетом. Нами было показано, что био пленки на стеклах с увеличением НЧС уменьшаются по сравнению с контролем. Важно заметить, что клетки в составе био пленки гибнут, однако ее матрикс практически не разрушается.

На рис. 4 показаны результаты конфокальной лазерной сканирующей микроскопии био пленок бактерий *E.coli* AB1157 после обработки их раствором HAuCl_4 . При концентрации 15 мкг/мл HAuCl_4 наблюдали уменьшение количества живых клеток по сравнению с контролем до 80%. Таким образом, Au^+ катионы вызывают гибель клеток в составе уже сформированных био пленок. Однако, клетки в составе био пленок значительно более устойчивы к действию ионов золота, чем планктонные клетки. При действии ионного золота наблюдается та же закономерность, что и при обработке био пленок соединениями серебра: бактериальные клетки в составе био пленок гибнут, однако ее матрикс разрушается слабо.

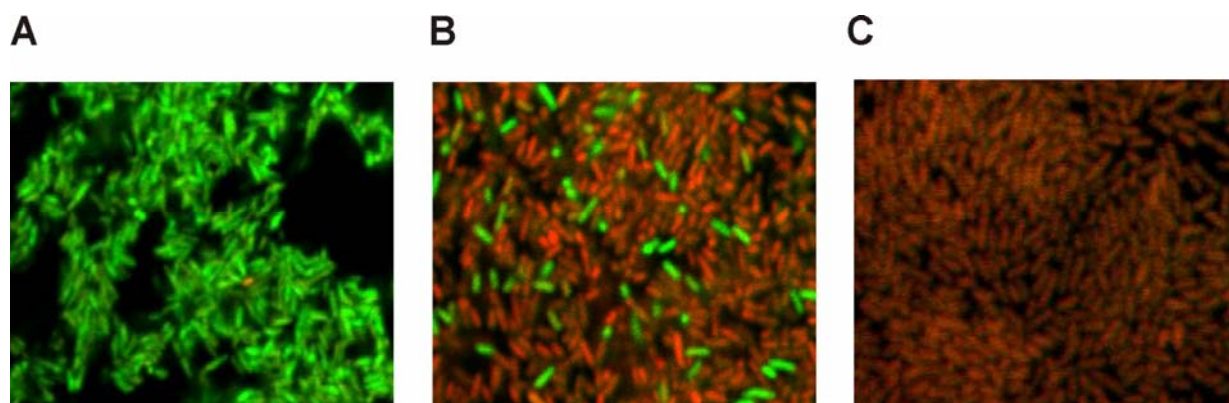


Рис. 4. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия био пленок бактерий *E.coli* AB1157 после обработки их HAuCl_4 : А- контроль, В- концентрация HAuCl_4 15 мкг/мл, С- концентрация HAuCl_4 150 мкг/мл.

Чувствительность к ионам серебра, золота и НЧС клеток *E. coli* с мутациями в генах, участвующих в глобальной регуляции экспрессии генов бактерий, репарации и рекомбинации ДНК, синтезе транспортных белков поринов

Для определения чувствительности к ионам серебра и золота и НЧС штаммов *E. coli* дикого типа и мутантов мы сравнивали минимальные ингибирующие концентрации (МИК) при действии этих соединений.

BER репарация ДНК (base excision repair) восстанавливает геномную ДНК после повреждений, вызванных действиями реактивных форм кислорода ROS (reactive oxygen species) и алкилирующих агентов. ROS, образовываясь внутриклеточно, могут повреждать структуру ДНК, белков и липидов. Основания ДНК крайне восприимчивы к окислительным повреждениям. Наиболее часто встречающимся и стабильным из таких повреждений является 8-оксогуанин (8-охоG). В присутствии таких повреждений нарушается целостность двойной спирали ДНК и блокируется ее репликация (Farg and Kogoma 1991). У *E. coli* существует целый ряд ферментов, которые инициируют выщепление модифицированных азотистых оснований путем гидролиза N-гликозидной связи. Было показано, что ионы серебра могут ингибировать дыхательные ферменты, способствуя синтезу активных форм кислорода, и тем самым вызывать окислительные повреждения бактериальной клетки (Holt and Bard 2005). С целью выяснения роли репарации окислительных повреждений ДНК в устойчивости клеток к действию AgNO_3 , НЧС и HAuCl_4 нами было проведено сравнение величин МИК при действии этих соединений для изогенных штаммов *E. coli* дикого типа и ряда мутантов, дефектных по белкам, участвующим в репарации ДНК этого типа.

Было показано, что инактивация генов *mutS*, *mut Y*, *mutM* и *mutT* приводит к уменьшению значения МИК при действии AgNO_3 по сравнению с клетками дикого типа (рис. 5B).

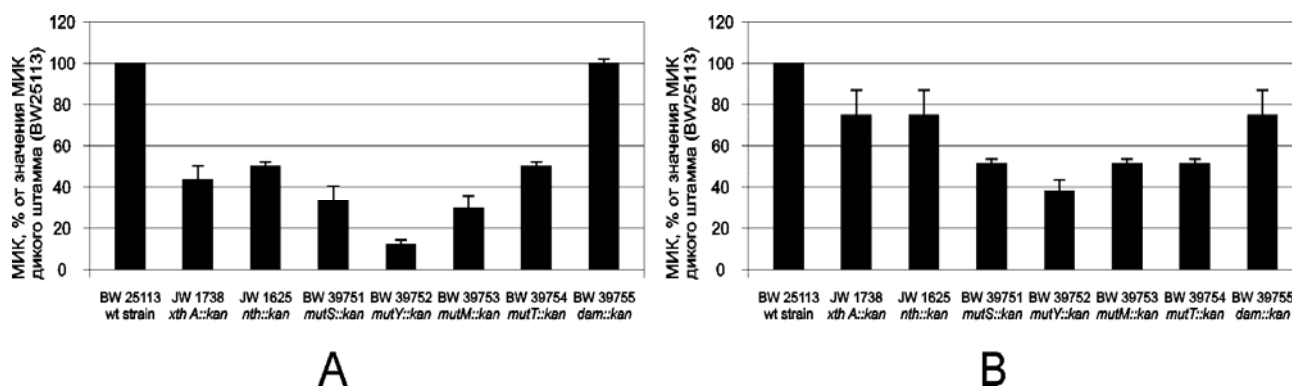


Рис 5. Влияние мутаций в генах, участвующих в репарации окислительных повреждений ДНК, на МИК *E. coli* при действии А: НЧС, В: AgNO_3

В случае действия различных концентраций НЧС инактивация генов *xthA*, *nth*, *mutS*, *mutM* и *mutT* также приводила к уменьшению резистентности мутантных клеток по сравнению с клетками дикого типа (рис.5А). Мутация в гене *mutY* понижала устойчивость клеток при действии НЧС до 10 раз. На основании этого, можно предположить, что эти гены могут быть вовлечены в восстановление окислительных повреждений ДНК, связанных с действием ионов и наночастиц серебра.

Сравнительное изучение чувствительности к ионам золота клеток *E. coli* BW25113 и указанных выше изогенных мутантных штаммов не обнаружило различия между этими штаммами. Это показывает, что чувствительность бактерий к соединениям золота не связана, по-видимому, с окислительными повреждениями ДНК.

Не наблюдалось различий в чувствительности к ионам серебра и золота, а также НЧС, штаммов *E. coli* дикого типа и штаммов, дефектных по эксцизионной репарации (*uvrA*, *uvrB* мутанты), SOS-репарации и рекомбинации (*recA*, *lexA*, *recBC*, *umuC* и *umuD* мутанты). Это позволяет предположить, что эти системы репарации ДНК не играют существенной роли в защите клеток от действия соединений серебра и золота.

Сигма S субъединица РНК-полимеразы, кодируемая геном *rpoS*, является глобальным регулятором, контролирующим транскрипцию большого количества генов при различных стрессовых воздействиях (Hengge-Aronis 2002). Можно было ожидать поэтому, что *rpoS* мутанты будут более чувствительными к действию ионов и наночастиц серебра, а также ионам золота; однако, мы не наблюдали подобного эффекта этой мутации.

Другой глобальный регулятор транскрипции, сигма N субъединица РНК-полимеразы (ее кодирует ген *rpoN*), участвующая в контроле азотного обмена бактерий (Magasanik 1994), также не оказывала заметного влияния на чувствительность *E. coli* к соединениям серебра и золота. Инактивация гена глобального регулятора белка CRP, участвующего в контроле катаболитной репрессии и экспрессии большого количества генов бактерий, не вызывала изменения чувствительности клеток *E. coli* к ионам серебра и золота и НЧС. Lon протеаза играет важную роль в деградации дефектных (денатурированных) и ряда короткоживущих регуляторных белков (Gottesman 1999) и также относится к глобальным регуляторам транскрипции генов бактерий. Сравнительное изучение чувствительности к соединениям серебра и золота клеток *E. coli* AB1157 и изогенного *lon⁻* мутантного штамма AB1899 не обнаружило различия между этими штаммами.

Quorum Sensing (QS) – специфический тип регуляции экспрессии генов бактерий, зависящей от плотности их популяции. QS системы включают низкомолекулярные

сигнальные молекулы, аутоиндукторы (АИ), легко диффундирующие через клеточную стенку, и регуляторные рецепторные белки, взаимодействующие с АИ. Представляло интерес исследовать вопрос о том, участвуют ли QS системы в регуляции чувствительности / устойчивости клеток бактерий к серебру и золоту. Штаммы *Pseudomonas* и *Serratia*, исследуемые в этой работе, содержали QS системы LuxI / LuxR типа, функционирующие с участием сигнальных молекул N-ацил-гомосеринлактонов (АГЛ).

Нами было показано, что по чувствительности к ионам серебра, золота и НЧС штаммы, несущие клонированный ген гомосеринлактоназы AiiA, деградирующей АГЛ, не отличались от штаммов, содержащих векторную плазмиду (*S. proteamaculans* 94/pME6863 *aiaA* и *S. proteamaculans* 94/pME6000, *P. chlororaphis* 449/ pME6863 *aiaA* и *P. chlororaphis* 449/ pME6000).

Было проведено также сравнение МИК штамма *Serratia liquefaciens* MG1 и мутанта этого штамма *S. liquefaciens* MG44, не способного синтезировать АГЛ. Мы также не видели различий в чувствительности к ионам серебра, золота и НЧС у этих двух штаммов. Таким образом, QS регуляция не участвовала в контроле чувствительности к серебру у исследованных бактерий, относящихся к разным видам и родам.

Антимикробные агенты, включая тяжелые металлы, должны войти в клетку, чтобы подействовать на соответствующие мишени. В проникновении различных низкомолекулярных соединений в клетки бактерий и выведении их из клеток участвуют порины – белки клеточной стенки бактерий, обладающие способностью образовывать заполненные водой поры (каналы).

Мы исследовали влияние мутаций в генах, кодирующих порины OmpF и OmpC, на чувствительность *E. coli* к нитрату и наночастицам серебра, а также ионам золота, у нескольких хорошо изученных штаммов (рис. 6). Мутантные штаммы, лишенные поринов OmpF или OmpC, или обоих поринов, были более устойчивыми к ионам серебра по сравнению со штаммом дикого типа; эффект мутаций для штаммов, лишенных одного из поринов (OmpC⁻) или обоих поринов вместе, колебался при действии ионов серебра в 3-4 раза по сравнению со штаммом дикого типа. Штамм, мутантный по порину OmpF⁻, был до 8 раз более резистентным к действию AgNO₃ (рис. 6B). О роли белков поринов в чувствительности бактерий по отношению к НЧС ранее не сообщалось. Нами было показано, что мутантный штамм, лишенный обоих поринов OmpF и OmpC, был наиболее устойчивым к НЧС по сравнению со штаммом дикого типа; эффект мутации колебался в разных опытах до 8 раз (рис. 6A). Однако следует отметить, что диаметр пор, образуемых белками поринами, колеблется в пределах 1,0÷1,1 нм (Pugsley and Schnaitman 1978;

Nikaido 1994). Такой размер пор в мембране бактериальных клеток предусматривает проникновение внутрь ионов серебра, но не НЧ размером 8,3 нм. В связи с этим, можно предположить, что антибактериальный эффект НЧС связан скорее с проникновением внутрь клеток ионов серебра, образуемых НЧС, чем самих НЧС.

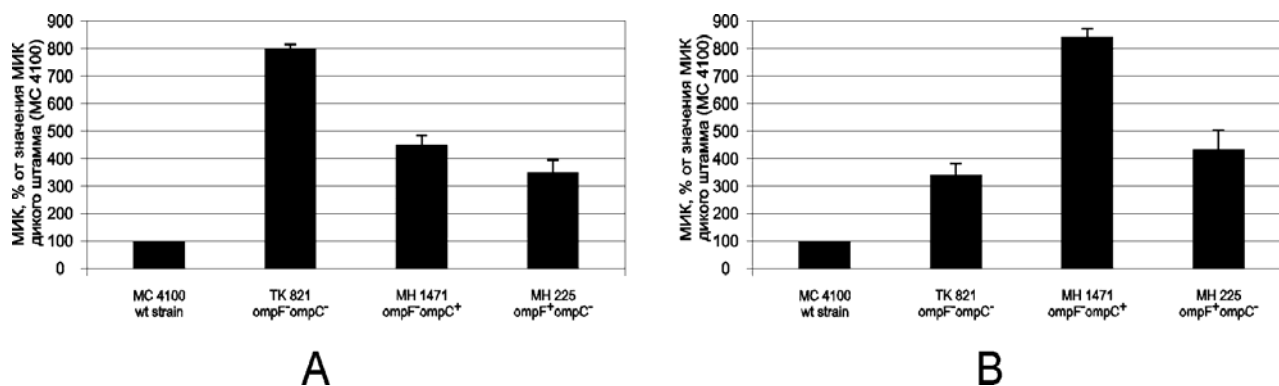


Рис 6. Влияние мутаций в генах белках поринов на МИК *E. coli* при действии А: НЧС, В: AgNO₃

Мутантные штаммы, лишенные поринов OmpF или OmpC, не отличались заметно по чувствительности к ионам золота по сравнению со штаммом дикого типа; тем самым подразумевается возможность иных механизмов транспорта ионов золота в клетки.

На основании полученных данных можно предположить, что механизмы антибактериального действия ионов золота и соединений серебра (ионы и НЧС) существенно различаются.

Фемтосекундная оптоперфорация стенки цианобактерий *Anabaena* sp. 7120 wt в присутствии наночастиц золота

Известно, что НЧС могут проявлять фотохимические и фототермальные эффекты при различных видах облучения.

Относительно недавно предложен метод оптоперфорации стенки клетки с использованием фемтосекундных лазерных импульсов (Tirlapur and Knig 2002; Stevenson et al. 2006). Оптическое разрушение стенки может использоваться для инактивации клеток, например, клеток патогенных бактерий (Pitsillides et al. 2003; Zharov et al. 2006). Кроме этого, специальным образом проведенная процедура перфорации стенки позволяет внедрить молекулы в биоклетку через непроницаемую для них мембрану, например, осуществить трансфекцию.

Совместно с сотрудниками Института проблем химической физики РАН, Черноголовка, нами был исследован эффект перфорации стенки цианобактерии *Anabaena* 7120 wt (в этих опытах *Anabaena* использована как модельный организм), покрытых НЧС,

при воздействии фемтосекундными импульсами с длиной волны 800 нм. Золотые наночастицы были образованы в среде растущих клеток цианобактерий при добавлении AuHCl_4 (См. ниже).

На рис. 7 показано изображение клетки цианобактерии *Anabaena* 7120 wt с НЧЗ на её поверхности, полученное с помощью электронного микроскопа, и приведена гистограмма размеров НЧ. Средний размер НЧ, определенный из этого изображения, составил 15 ± 6 нм. Форму большинства НЧ можно аппроксимировать сферой, также встречаются более крупные НЧ в форме пластин.

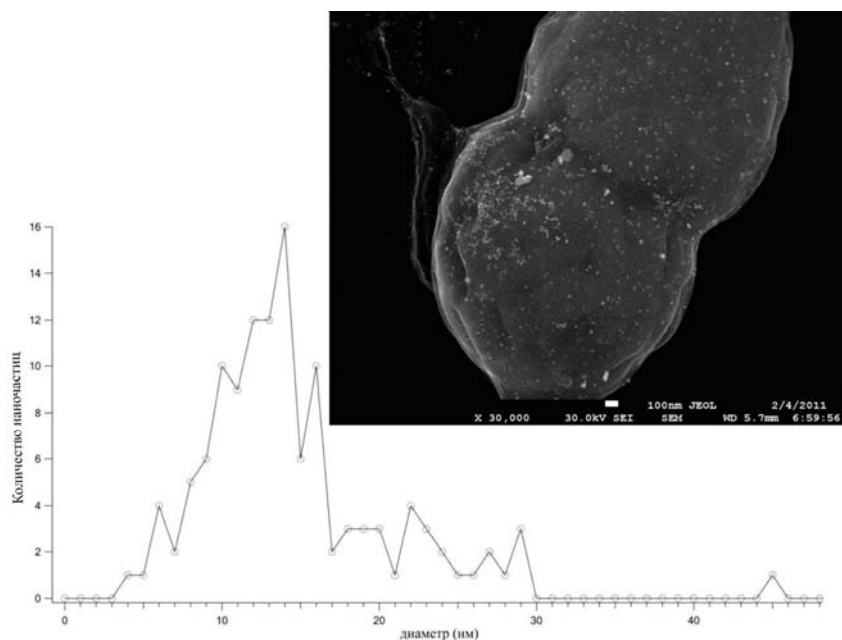


Рис. 7. Гистограмма распределения НЧЗ по размеру и изображение клетки цианобактерии *Anabaena* 7120 wt с НЧЗ на её поверхности (светлые пятна). *Anabaena* 7120 wt с золотыми наночастицами после 4 недель роста $[\text{AuHCl}_4]=0,25$ mM. При получении электронно микроскопического изображения клетка находилась в камере высокого давления, что привело к её деформированию.

На клетки с НЧЗ на её поверхности действовали сфокусированным фемтосекундным лазерным излучением, с различными временами экспозиции и энергиями в импульсе, при этом наблюдалось образование перфорированного отверстия (ПО) в стенке или образование пузырька кипения (ПК). Эти типы разрушения клеточной стенки имели место как для клеток с НЧЗ, так и в случае контрольных образцов клеток без золота. Рис. 8 демонстрирует типичный процесс образования ПК при облучении клетки импульсами с высокой энергией, что сопровождается разрывом стенки. На рис. 9 показано образование ПО при более низкой энергии в импульсе.

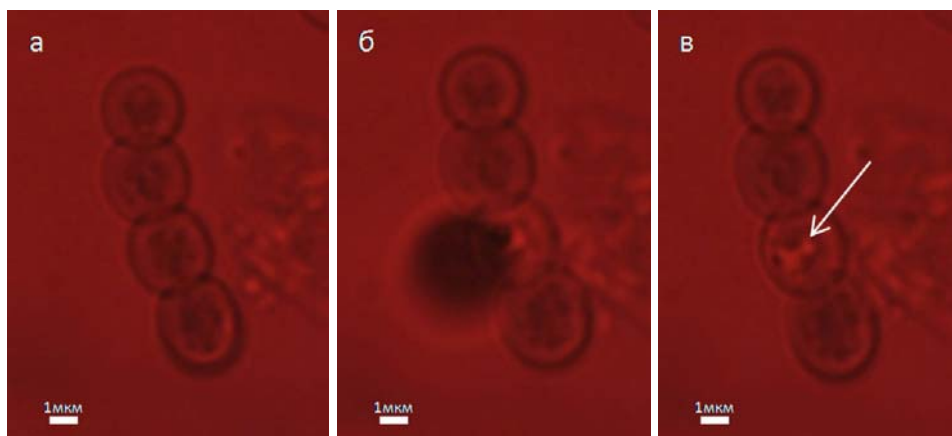


Рис. 8 На рисунке показаны: а) клетки до включения лазера, б) образование пузырька кипения после 10 мсек облучения импульсами 0,7 нДж, в) образование отверстия с неровными краями, как результат ПК.

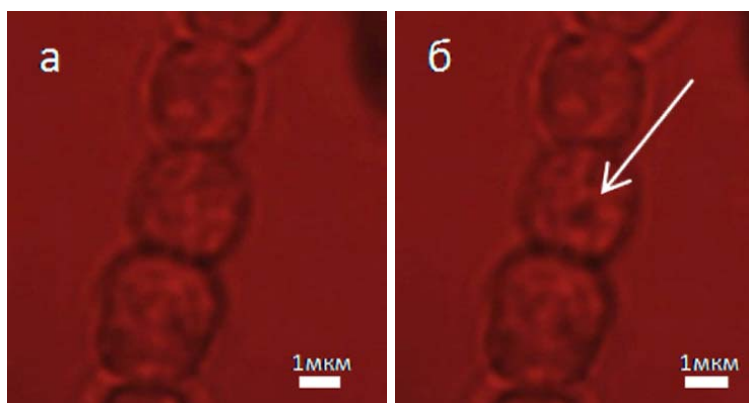


Рис. 9. На рисунке показаны: а) клетки до включения лазера, б) образование перфорированного отверстия клеточной стенки после включения лазера (0,15 нДж/50мс)

Наблюдения показали, что в случае клеток, содержащих НЧЗ, образование пузырька кипения и перфорированного отверстия наблюдаются при более низких энергиях импульса и при менее длительных экспозициях воздействия фемтосекундного лазерного излучения по сравнению с контролем (клетки, не обработанные НЧЗ). Полученные данные указывают на снижение энергетического порога оптоперфорации клеточной мембраны в присутствии НЧЗ. Среди механизмов активации оптической перфорации золотыми наночастицами могут быть рассмотрены два возможных предположения: усиления оптического поля и локального теплового разогрева в районе нахождения НЧЗ.

Разработка метода разрушения биопленок с помощью лазерного облучения наночастиц золота

Как говорилось выше, борьба с биопленками представляется очень важной задачей в современной медицине. В настоящее время установлено, что многие хронические инфекции, которые возникают при использовании медицинского имплантируемого оборудования – катетеров, глазных линз, искусственных клапанов сердца, протезов и др. – связаны со способностью патогенных бактерий образовывать биопленки на этих устройствах или внутри них. В связи с этим совместно с сотрудниками Института проблем химической физики РАН нами были сделаны первые шаги в сторону разработок альтернативных способов борьбы с биопленками. Представляло интерес провести опыты по действию фемтосекундного лазерного излучения на биопленки *E. coli*, обработанные НЧЗ, для того чтобы попытаться точно разрушить клетки в составе биопленок или ее матрикс. Такой способ разрушения биопленок может быть в дальнейшем использован в комплексе с применением антибактериальных средств.

Для исследования этого способа разрушения биопленок были выращены биопленки *E. coli* на стеклах, далее на биопленки наносилось некоторое количество НЧЗ и затем полученные образцы облучались фемтосекундным лазером. Параллельно проводилось облучение контрольных биопленок (без их обработки НЧ).

На рис. 10А приведена съемка слоя биопленок на стеклянной подложке до действия фемтосекундного лазерного облучения и после него (рис. 10 В и С).

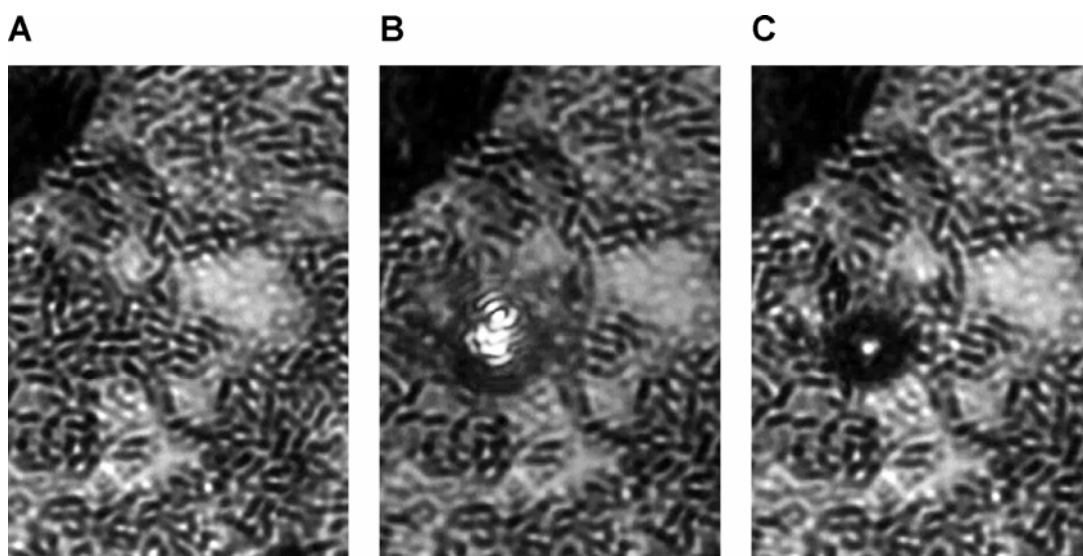


Рис. 10. На рисунке показаны: А) клетки в составе биопленок до включения лазера, В) образование пузырька кипения после 30 мсек облучения импульсами мощностью 40 мВт, С) образование отверстия в слое биопленок, как результат ПК.

Результаты опыта показывают точечное разрушение слоя биопленок, с увеличением энергии импульса происходит более активное разрушение биопленок. Следует отметить, что при облучении слоя биопленок, не обработанных НЧЗ импульсом мощностью до 60 мВт, видимых разрушений не наблюдается.

Таким образом, НЧЗ снижают энергетический порог повреждения клеток. Образование субмикронных отверстий в биопленках может привести к разрушению слоя биопленок и появлению локальных отверстий, нарушающих их целостность. Отверстия в биопленках могут способствовать улучшению проникновения внутрь биопленок антибактериальных препаратов. Таким образом, предложенный метод разрушения биопленок является первым этапом в исследованиях возможности деградации уже образованных биопленок с использованием НЧЗ и лазерного облучения.

Получение наночастиц металлов биологическими способами

Вторым аспектом этой работы является разработка методов получения наночастиц металлов биологическими способами. В последнее время уделяется большое внимание разработке таких методов, так как их использование открывает новые возможности для развития экономически выгодных способов получения НЧ заданной формы и размера.

В качестве субстрата для получения НЧ использовались растворы HAuCl_4 . В экспериментах были использованы бактерии различных таксономических групп. Длительность культивирования варьировала от 3 дней до 4 дней роста, менялись условия роста. Все опыты проводились при комнатной температуре в аэробных условиях роста. Первоначально оценку образования наночастиц проводили визуально (при образовании НЧЗ цвет культурального раствора изменялся в зависимости от размера наночастиц от бледно-розового до пурпурно красного), а затем с помощью снятия спектров поглощения суспензии клеток с образованными НЧ и без них на спектрофотометре Shimadzu; наиболее удачные образцы отбирались для сканирующей электронной микроскопии SEM (scanning electron microscope). На рис. 11 представлена электронная микрофотография НЧЗ, которые были получены при инкубировании клеток цианобактерии *Anabaena* 7120 wt с раствором ионов золота.

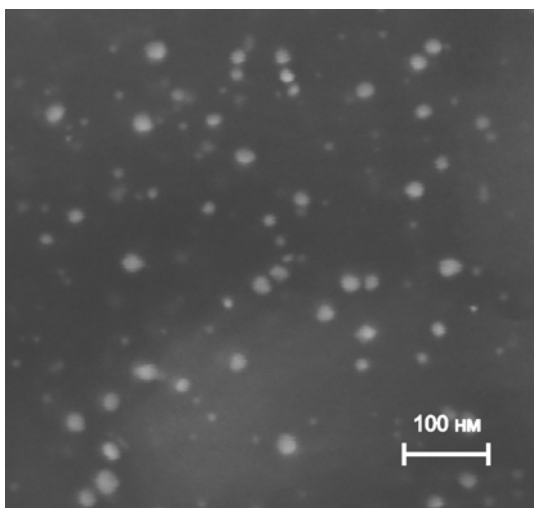


Рис.11. Электронная микрофотография НЧЗ, полученных при инкубировании штаммов бактерий с раствором соли золота $[HAuCl_4]=0,25$ mM (SEM микроскопия).

На рис. 12 представлены стандартные спектры экстинкции суспензии исходных клеток *Anabaena* 7120 wt и клеток с НЧЗ.

Образование НЧЗ приводит к существенным изменениям спектров экстинкции, что проявляется в виде пика плазмонного резонанса НЧ в области 552 нм. Образование НЧЗ в *Anabaena* sp. PCC 7120 сопровождается выцветанием пигментов цианобактерии на длинах волн ~ 436 нм и ~ 680 нм хлорофилла, ~ 496 нм каротиноидов, ~ 628 нм фикобилисом (Liu et al. 2005), что может говорить о гибели клеток цианобактерий в процессе биогенеза.

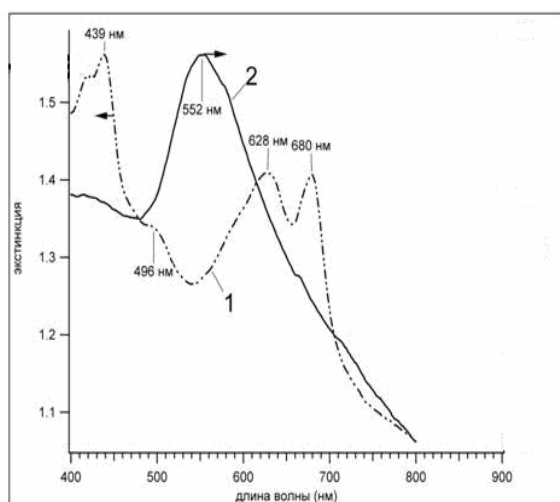


Рис. 12. Спектры экстинкции суспензий 1) исходных клеток *Anabaena* 7120 wt, 2) клеток *Anabaena* 7120 wt с золотыми наночастицами после 4 недель роста $[AuHCl_4]=0.25$ mM.

Была исследована возможность получения НЧЗ при использовании бактерий различных таксономических групп (цианобактерии *Anabaena*, *Nostoc* -3 штамма, *Synechocystis*, *Synechococcus* – 4 штамма; *Azotobacter vinelandii*, *Azotobacter chroococcum*) и варьировании условий культивирования (разные концентрации соли золота, среды с добавлением азота и без, темновые и световые условия роста, разное количество углеводов).

В ходе работы было показано, что образование НЧЗ наблюдается только у азотофиксирующих бактерий, таких как *Anabaena*, *Nostoc*, *Azotobacter*, и не происходит у остальных исследованных организмов. При добавлении в культуральную среду этих азотофиксаторов азота извне (NaNO_3 в случае цианобактерий и $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в случае *Azotobacter*) процесс образования НЧЗ не наблюдается или наблюдается в значительно меньшей степени. НЧЗ образуются также в супернатантах выше перечисленных бактерий. В темновых условиях роста цианобактерий образование НЧЗ не наблюдалось. С увеличением времени культивирования количество и размер НЧ растёт, что подтверждено спектрофотометрически.

Основываясь на полученных данных, образование наночастиц металлов с помощью биогенеза представляется нам простым, дешевым и продуктивным способом.

ВЫВОДЫ

1. Определены закономерности ингибирующего действия ионов серебра, золота и наночастиц серебра (НЧС) на планктонный рост и образование биопленок *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Serratia proteamaculans*. Эти соединения вызывали разрушение образованных биопленок *E. coli* и гибель клеток в них в концентрациях значительно более высоких (в 20-30 раз), чем те, которые подавляют рост и формирование биопленок.

2. Мутации в генах, ответственных за репарацию окислительных повреждений ДНК (*mutY*, *mutS*, *mutM*, *mutT*, *nth*), увеличивали чувствительность клеток к НЧС и ионам серебра, что предполагает участие указанных генов в репарации повреждений ДНК, вызванных соединениями серебра.

3. Мутации в генах, участвующих в репарации окислительных повреждений ДНК, не оказывали заметного влияния на чувствительность клеток *E. coli* к ионам золота. Это свидетельствует о различиях в механизмах действия на клетки ионов золота и соединений серебра. Не обнаружено антибактериального действия наночастиц золота (НЧЗ) на клетки бактерий в обычных условиях выращивания.

4. Мутации в генах, ответственных за эксцизионную и SOS – репарацию ДНК, не влияли на чувствительность *E. coli* к НЧС, ионам серебра и золота. Это показывает, что антибактериальное действие соединений серебра и золота не связано со значительными повреждениями ДНК, которые могут быть восстановлены при участии этих репаративных систем.

5. QS системы LuxI/LuxR типа не участвовали в контроле чувствительности / устойчивости к соединениям серебра и ионам золота у *P. chlororaphis* и *Serratia*. Мутации в генах глобальных регуляторов *E. coli rpoS*, *crp*, *lon* не влияли на чувствительность бактерий к соединениям серебра и золота.

6. Мутантные штаммы *E. coli* с инактивированными генами транспортных белков поринов OmpF и OmpC были в 4 – 8 раз более резистентны к НЧЗ и ионам серебра, чем штамм дикого типа, что свидетельствует о важной роли поринов в антибактериальном действии этих соединений.

7. Показано, что НЧЗ при действии фемтосекундного лазерного излучения способствуют оптоперфорации клеточной стенки цианобактерий и биопленок *E. coli*.

8. Получены стабильные НЧЗ при культивировании на среде с солью трехвалентного золота цианобактерий (*Nostoc*, *Anabaena*) и *Azotobacter* в условиях азотфиксации.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в научных журналах

1. Antibacterial effects of silver nanoparticles on gram-negative bacteria: Influence on the growth and biofilms formation, mechanisms of action// M.A. Radzig, V.A. Nadtochenko, O.A. Koksharova J. Kiwi, V.A. Lipasova, I.A. Khmel // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces // 2013, V. 102 P. 300– 306

2. Фемтосекундная оптоперфорация стенки цианобактерий *Anabaena* sp. 7120 wt в присутствии наночастиц золота// Ю. Барбашов, А.Залеский, А.Айбушев, О.М. Саркисов, М.А. Радциг, И.А.Хмель, О.А. Кокшарова, В.А. Надточенко // Российские нанотехнологии// 2011, Том 6, №9-10, С. 32-37.

3. Антимикробное действие наночастиц металлов и полупроводников // В.А.Надточенко, М.А.Радциг, И.А.Хмель// Российские нанотехнологии// 2010, Том 5, №5-6, С. 37-46

4. Антибактериальные эффекты ионов серебра: влияние на рост грамотрицательных бактерий и образование биопленок // М.А.Радциг, О.А.Кокшарова, И.А.Хмель// Молекулярная генетика, микробиология и вирусология// 2009, №4, С.27-31.

Тезисы конференций

1. M.A. Radzig and I.A. Khmel // Effect of silver nanoparticles on growth and biofilm formation of Gram-negative bacteria, mechanisms of action// II International Conference on Antimicrobial Research (ICAR2012), Lisbon, Portugal, 21-23 ноября 2012

2. Nadtochenko V., Alboushev A., Radzig M., Barbashov Yu., Kiwi J., Kostrov A., Kanaev A., Museur L., Khmel I. // Plasmonics and antibacterial effects // 7th European meeting on solar chemistry and photocatalysis: environmental applications, Porto, Portugal – 17-20 June 2012. p. 21-23.

3. М. А. Радциг, О. А. Кокшарова, В.А. Надточенко, И. А. Хмель// Изучение антибактериальных эффектов ионов золота.Биогенез наночастиц золота с помощью различных бактерий // XXIV Зимней молодежной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Москва, 7-9 февраля 2012 г.;

4. Радциг М.А., Хмель И.А.// Особенности антибактериального действия наночастиц серебра// 3 Евразийский Конгресс по медицинской физике и инженерии «Медицинская физика – 2010», Москва 2010, 21-25 июня, Т.3. Раздел: Нанотехнологии в медицине, стр. 324-326.

5. Радциг М.А., Хмель И.А.// Антибактериальные эффекты наночастиц серебра// Сборник тезисов докладов участников второго международного конкурса научных работ молодых ученых в области нанотехнологий, Москва 2009, 6-8 октября, стр. 805-807.

6. Радциг М.А., Хмель И.А.// Антибактериальные эффекты ионов и наночастиц серебра// Тезисы международной научной конференции по биоорганической химии, биотехнологии и бионанотехнологии, посвященной 75-летию со дня рождения ак. Ю.А.Овчинникова, Москва-Пушино 2009, 28 сент-1 окт., стр. 331-332.

7. Радциг М.А., Кокшарова О.А., Липасова В.А., Хмель И.А.// Бактериальный рост, формирование биопленок и Quorum Sensing регуляция при действии ионов и наночастиц серебра.//Тезисы докладов конференции физиология и генетика микроорганизмов в природных и экспериментальных системах, Москва 2009, 26-29 мая, стр. 185-186.

8. Радциг М.А., Кокшарова О.А., Хмель И.А.//Действие наночастиц серебра на бактерии: жизнеспособность, образование биопленок и Quorum Sensing регуляция.// Тезисы докладов Международного форума по нанотехнологиям, Москва 2008, 3-5 декабря, стр.296-298.