

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА  
НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ВИСОКИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Завідувач кафедри молекулярної біотехнології та  
біоінформатики

доц. Олексій Юрійович Нипорко

Протокол №\_\_\_\_ засідання кафедри

від “ \_\_\_\_ ” \_\_\_\_\_ 2022 р.

**ВПЛИВ СТАБІЛІЗАТОРА ТА УМОВ ЗБЕРІГАННЯ НАНОЧАСТИНОК  
НА ЇХ АНТИБАКТЕРІАЛЬНУ АКТИВНІСТЬ**

Випускна кваліфікаційна робота бакалавра

студентки спеціальності

091 «Біологія»

ОП «Біологія (високі технології)»

**Гордовської Наталії Владиславівни**

Науковий керівник:

асистент кафедри нанофізики

конденсованих середовищ

**к.ф.-м.н. Русінчук Наталя Миколаївна**

Оцінка захисту роботи

---

**Київ — 2022 р.**

## АНОТАЦІЯ

Гордовська Н.В. - "Вплив стабілізатора та умов зберігання наночастинок на їх антибактеріальну активність". Експериментальне та теоретичне дослідження оптичних властивостей нанобіосистем. Залежність антибактеріальних властивостей наночастинок від складу та умов зберігання. – Випускна кваліфікаційна робота бакалавра за спеціальністю 091 Біологія ОП «Біологія (високі технології)». У роботі проведено дослідження антибактеріальних властивостей наночастинок у залежності від стабілізатора та температури зберігання. Встановлено, що існує нелінійна залежність коефіцієнтів агрегації наночастинок від температури зберігання; що стабілізатор наночастинок впливає на їх антибактеріальну дію, а отже є важливим фактором, який необхідно враховувати при проведенні біологічних досліджень з наночастинками. Отримані результати можуть бути використані для подальшої розробки методик терапії мультирезистентних штамів після клінічних досліджень.

Ключові слова: наночастинки, бактерії, антибактеріальна активність, стабілізатор, спектр поглинання, агрегація.

	3
<b>Зміст</b>	
<b>Вступ</b>	5
<b>РОЗДІЛ 1</b>	
<b>ПОТОЧНИЙ СТАН ДОСЛІДЖЕНЬ ЗА ТЕМАТИКОЮ</b>	7
1.1. Застосування наночастинок	8
1.1.1 Використання оптичних властивостей наночастинок для детектування та вивчення біооб'єктів	8
1.1.2. Застосування у терапії	12
1.1.3 Інші застосування	15
1.1.4 Антимікробні властивості	17
1.2 Параметри наночастинок, що впливають на їх біологічні властивості	21
1.3. Синтез наночастинок	24
<b>РОЗДІЛ II</b>	
<b>ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА</b>	<b>29</b>
2. Постановка задачі, матеріали та методи	29
2.1. Постановка задачі, вибір матеріалів та методів	29
2.2. Отримання монокультури бактерій	30
2.2.1. Підготовка щільного поживного середовища	30
2.2.2. Підготовка культури бактерій	31
2.2.3. Отримання монокультури	31
2.2.4. Підготовка рідкого поживного середовища	31
2.2.5. Інокуляція середовища та інкубація	32
2.3. Перевірка чутливості бактерій до наночастинок	32
2.4. Дослідження оптичних властивостей наносистем та нанобіосистем	33
2.5 Параметри наночастинок	33
<b>РОЗДІЛ III</b>	
<b>РЕЗУЛЬТАТИ</b>	<b>35</b>

	4
3.1. Тестування чутливості бактерій до наночастинок залежно від їх стабілізатора	35
3.2. Властивості наночастинок за різних умов зберігання	37
3.3. Оптичні властивості нанобіосистем	42
<b>ВИСНОВКИ</b>	<b>45</b>
<b>Список використаних джерел</b>	<b>47</b>

## Вступ

Розробка нових противірусних та протибактеріальних агентів — це задача сучасної науки, що не втрачає актуальності вже багато років. Однією з проблем є здатність вірусів та бактерій адаптуватись до механізмів дії лікарських препаратів шляхом мутагенезу [1–3]. Явище набутої резистентності характерне для різноманітних вірусів (ДНК-вірус гепатиту В [4], РНК-вірус грипу H3N2 [5], РНК-вірус імунодефіциту людини [2, 6]) та бактерій [3, 7–9]. Досі є нестача специфічних методів противірусної терапії або вакцин від певних вірусів, наприклад вірусу чікунгуньї [10]. З цих причин, пошук нових противірусних агентів це релевантна та актуальна задача, для вирішення якої нам необхідно звертати увагу на нові досягнення сучасної науки та технологій. Одне із цікавих рішень лежить у галузі нанотехнологій. Загальновідомо, що численні типи наночастинок грають важливу роль у наномедицині, зокрема в терапії вірусів. Проте залишається ще багато простору для вивчення питання їх практичного застосування у вірусній і бактеріальній терапії через різноманіття форм і розмірів, їх стабілізаторів, методів синтезу та складу металів. Власне, **актуальність** даної роботи полягає у визначенні більш ефективних стабілізаторів для наночастинок, що матимуть кращий результат за нижчих концентрацій.

**Метою роботи** стало дослідження різниці ефективності та стабільності наночастинок з різними стабілізаторами. Задля досягнення мети було поставлено такі **завдання**:

1. Здійснити огляд літератури для визначення актуального стану досліджень та подальшого окреслення експериментальних методик.
2. Виконати дослідження кореляції між стабільністю наночастинок та температурою зберігання за допомогою UV / Vis спектрофотометрії.
3. Дослідити оптичні властивості нанобіосистем з різними концентраціями наночастинок у динаміці.

4. Кількісно визначити чутливість бактерій до різних концентрацій наночастинок за допомогою обраних мікробіологічних методів.

Робота виконувалась в рамках проєкту НФДУ 2020.02/0352 «Особливості взаємодії наночастинок з вірусами та мікроорганізмами різних типів. Імплементация до антивірусної та антимікробної терапії». За отриманими результатами підготовлено тези для представлення на міжнародній науковій конференції 2022 IEEE 12th International Conference Nanomaterials: Applications & Properties (Краків, Польща, 11–16 вересня 2022), та двоє матеріалів для представлення на міжнародній науковій конференції 2022 IEEE 41st International Conference on Electronics and Nanotechnology (ELNANO) (Київ, Україна) з їх подальшою публікацією в БД Scopus.

## РОЗДІЛ 1

**ПОТОЧНИЙ СТАН ДОСЛІДЖЕНЬ ЗА ТЕМАТИКОЮ**

Нерелевантне або неправильне застосування людиною антибіотиків і висока мутагенна здатність бактерій призвели до виникнення нової проблеми у питанні терапії бактеріальних захворювань. Супербактерії, або ж мультирезистентні штами бактерій — серйозна загроза здоров'ю та життю мас, оскільки ці мікроорганізми втратили чутливість до антибіотиків внаслідок генних мутацій. Це нашоухує на висновок, що необхідно досліджувати альтернативні методи подолання бактеріальних захворювань, скажімо шляхом фізичного впливу на бактерії. Одне з потенційних рішень можна знайти у гільці нанотехнологій — наночастинки мають унікальні властивості та показують відносно низьку токсичність щодо макроорганізмів. Все це вже надало наночастинкам широкого застосування у біомедицині.

Нанотехнології — технології створення, керування властивостями та використання матеріалів, хоча б один з вимірів яких лежить в діапазоні приблизно від 1 до 100 нанометрів. Сфера нанотехнологій загалом включає в себе синтез, характеристику, а також застосування наноматеріалів. Нанотехнології зараз є важливою сферою вивчення фармацевтики, розробки ліків, а також молекулярної інженерії. Історія нанотехнологій бере початок з давніх часів, коли люди ще не мали належних навичок, щоб використовувати їх у своїх інтересах. Прикладом такого є «чаша Лікурга» (4 ст. н.е.) [11], виготовлена з дихроїчного скла з додаванням наночастинок золота діаметром 40 нм.

Лише у 1959 році нанотехнології потрапили в центр уваги Річарда Фейнмана: він досліджував концепцію маніпуляції речовиною на атомному рівні. Через 15 років, у 1974 році, Норіо Танігучі вперше використав термін «нанотехнології» для пояснення процесів, що відбуваються в діапазоні нанорозмірів, хоча лише після відкриття фулеренів у 1980-х роках «нанотехнології» стали поширеним терміном у дослідженнях, що й ознаменувало початок золотого пори цієї сфери науки. Нині нанотехнології

потенційно можуть застосовуватися у різних галузях, таких як інформаційні технології, доставка ліків, контроль забруднення та виробництво унікальних матеріалів.

## **1.1. Застосування наночастинок у біомедицині**

### **1.1.1 Використання оптичних властивостей наночастинок для детектування та вивчення біоб'єктів**

#### 1) Флуоресцентні мітки

Нанокристали-напівпровідники можуть використовуватися як флуоресцентні мітки в біологічному фарбуванні та діагностиці. Порівнюючи зі звичайними флуорофорами, нанокристали мають вузький, регульований симетричний спектр випромінювання і є фотохімічно стабільними. Переваги широкого безперервного спектру збудження продемонстровані в маркуванні з подвійним випромінюванням і одним збудженням на фібробластах миші. Проби нанокристалів можуть як доповнювати, так і перевершувати існуючі флуорофори.

Переваги — чітке випромінювання з малим діапазоном хвилі і можливість забарвлювати різними кольорами за допомогою однієї вхідної хвилі і декількох НЧ. Дуже висока стабільність проти фотознебарвлення («вицвітання», photobleaching) — сотні наносекунд. Можливість зміни внутрішньоклітинного таргетингу частинок за допомогою додаткових оболонки. [12]

#### 2) Біовиявлення патогенів

Загроза біологічної війни викликає дедалі більше занепокоєння. Успіхи мікробіології та генної інженерії зробили можливим створення надзвичайно небезпечних мікроорганізмів. Оскільки методи виявлення цих агентів і лікування інфекції в даний час обмежені, розробка високочутливих датчиків для раннього виявлення біологічних агентів є надзвичайно важливою.

Існує багато способів виявлення біологічних молекул, однак більшість біосенсорів спираються на конкретні сайти молекулярного розпізнавання, такі як антитіло-антиген, ДНК-ДНК або інші взаємодії ліганд-рецептор між молекулами.

Bead ARray Counter (BARC) — багатоаналітний біосенсор, який використовує гібридизацію ДНК, магнітні мікрогранули та гігантські магніторезистивні (GMR) датчики для виявлення та ідентифікації біологічних бойових агентів. ДНК-зонди нанесені на твердий субстрат-чіп безпосередньо над датчиками GMR. Зразок аналіту, що містить комплементарну ДНК, гібридується з зондами на поверхні. Потім вводять мічені магнітні кульки мікронного розміру, які специфічно зв'язуються із зразком ДНК. Застосовується магнітне поле, видаляючи всі кульки, які специфічно не зв'язані з поверхнею. Гранули, що залишилися на поверхні, розпізнаються датчиками GMR, а інтенсивність і розташування сигналу вказують на концентрацію та ідентичність патогенів, присутніх у зразку. Оскільки кожен датчик GMR здатний виявляти одну магнітну кульку, теоретично біосенсор BARC повинен бути здатним виявити присутність однієї молекули аналіту.

Значною перевагою датчика перед більш традиційними методами виявлення є те, що застосовується градієнт магнітного поля, щоб перевірити зв'язок між взаємодіючими молекулярними видами. Застосована сила розрізняє специфічно і неспецифічно зв'язані види, що призводить до підвищеної селективності (тобто менше хибнопозитивних і негативних результатів) і підвищеної чутливості (тобто нижчий фон). [13]

### 3) Виявлення білків

AuNP та AgNP можуть визначати білки з вражаючою чутливістю. Ця техніка може допомогти дослідникам з протеоміки виявити білки, присутні в дуже незначних кількостях, і пов'язати їх припливи та відпливи з різноманітними захворюваннями. Це може допомогти діагностувати точкове захворювання, що ще не розповсюдилося на весь організм.

У дослідженні Nam *et al.* [14] метою був простат-специфічний антиген (PSA), білок, який може вказувати на рак передміхурової залози у чоловіків і який також досліджується як можливий маркер раку молочної залози у жінок.

Для виявлення PSA було обрано 2 типи наночастинок: 1-мікрметрові пластикові сфери з магнітними залізними оболонками та набагато менші немагнітні AuNP. Дослідники зв'язали частинки заліза з моноклональними антитілами (утворені шляхом генної інженерії), що можуть приєднуватися до

PSA так само як звичайні антитіла. Наночастинки золота приєднали до поліклональних антитіл, які приєднуються до різних сайтів PSA, а також «помітили» їх тисячами фрагментів одноланцюгової ДНК, пов'язаної з ще коротшими комплементарними ланцюгами. Ці короткі ланцюги слугували «біо-штрих-кодами» для ідентифікації PSA, до яких приєднувалися наночастинки. Далі дослідники активували магнітне поле — якщо PSA був присутній, то і він, і будь-які приєднані наночастинки, що містять ДНК, притягувалися до стінок пробірки. Далі «штрих-коди» вивільняють та аналізують. Метод здатний виявляти білки з 3-атомолярною концентрацією завдяки підсиленню сигналу великою кількістю «штрих-кодів». При цьому звичайний метод виявлення білків за допомогою антитіл має 3-пікомолярну чутливість, що вимагає в мільйон разів вищої концентрації білка. Техніка також не обмежується відстеженням білків один за іншим. Встановлюючи рої частинок, пов'язаних із різними антитілами та відповідними штрих-кодами, дослідники могли навіть виявити сотні різних цілей одночасно.

#### 4) Дослідження структури ДНК

Підвищений інтерес до дослідження структури ДНК породив новий метод дослідження структури ДНК у розведеному розчині: адсорбцію олігонуклеотидів певної послідовності до частинок розміром з білок. Частинки є «квантовими точками» напівпровідникового CdS. Виявлено, що поверхнево-чутлива люмінесценція цих частинок може розрізняти «прямі», «вигнуті» та «зігнуті» олігонуклеотиди в розведеному розчині. [15]

## 5) Фагокінетичні дослідження

Рухливість і міграція ракових клітин є надзвичайно шкідливими властивостями, які призводять до метастазування та утворення вторинних пухлин. Відомо, що міграція клітин та їх метастатичний потенціал корелюють, тому метастатичний потенціал можна швидко проаналізувати, просто вимірюючи рухливість. Останні досягнення в напівпровідникових нанотехнологіях потенційно можуть дозволити покращити аналізи рухливості клітин на основі фагокінетичного поглинання колоїдних квантових точок.

Найпряміший метод спостереження за рухомістю клітин — прискорене відео клітин у культурі — обмежується вимірюванням лише кількох клітин одночасно, і тому цей підхід не широко використовується для статистично значущих досліджень популяцій клітин. Покращену статистику можна отримати за допомогою «методу подряпини», при якому область субстрату клітинної культури очищується від клітин, а потім вимірюється необхідний час для заповнення цієї «дірки». На жаль, аналіз ускладнюється суб'єктивним аналізом складних і змінних моделей руху клітин. Значний прогрес відбувся з розробкою аналізу інвазії камери Бойдена, в якому клітини висівають з одного боку мембрани, а швидкість появи клітин з іншого боку контролюється. Цей метод є найбільш широко використовуваним, але він надзвичайно трудомісткий; він вимагає, щоб клітини були закріплені, а отже, знищені, і це, звичайно, не дозволяє змінювати зовнішні умови в реальному часі.

Двадцять п'ять років тому Альбрехт-Бюлер запропонував метод вивчення рухливості клітин, заснований на спостереженні «фагокінетичних слідів». У найзагальнішому вигляді можна сказати, що фагокінетична доріжка генерується, коли клітина проходить через шар «маркерів» і поглинає їх, залишаючи за собою порожню пляму, рівну площі, яку пройшла клітина. Методика є дуже потужною, оскільки забезпечує швидкий та автоматичний

метод інтеграції рухливості клітин із збереженням історії окремих шляхів. До цього часу метод використовувався лише обмежено через проблеми з доступними маркерами. Люмінесценцію не можна було використовувати для фагокінетичного відстеження, оскільки органічні барвники занадто швидко вицвітають. Натомість, єдиний маркер, який використовувався, — це субмікрометрові частинки Au, які можна відобразити оптично під час передачі. Вони накладають багато обмежень, тому ця техніка не отримала широкого визнання.

Колоїдні квантові точки — це кристали неорганічних напівпровідників розміром з білок, спочатку розроблені для оптико-електронних застосувань. Вони є надійними та ефективними випромінювачами світла з широким спектром застосувань у маркуванні клітин. Коли частинки Au покриті відповідним стабілізатором, таким як діоксид кремнію, вони стабільні у фізіологічних буферних умовах. До цього часу експерименти з біологічним маркуванням на основі квантових точок обмежувалися статичним маркуванням. У статті Parak *et al.* [16] показано, що колоїдні напівпровідникові нанокристали спонтанно поглинаються різними клітинами, залишаючись при цьому повністю люмінесцентними, що дозволяє відстежувати динамічні явища всередині клітин протягом кількох тижнів. Це явище можна використовувати для зображення фагокінетичних треків на основі квантових точок.

### **1.1.2. Застосування у терапії**

#### **1) Доставка ліків і генів**

Трансдукція (процес переносу ДНК) вірусного вектору залежить від концентрації вектору та часу його впливу на мішені.

На прикладі мікрочастинок, які потенційно проявляють схожі до наночастинок властивості, *in vitro* експерименти демонструють, що вільний від частинки вектор має таку ж ефективність трансдукції, як і вектор, зв'язаний з мікрочастинками у стократно зменшеній кількості. До того ж,

використовуючи магнітні мікросфери, можна таргетно діяти на певний регіон інфекції. *In vivo* експерименти також показали підвищену ефективність вектора у комплексі з мікрочастинками. [17]

## 2) Діагностика та терапія раку

- Інгібування метастаз раку наночастинками

Злоякісні пухлини є однією з провідних причин смертності людей у багатьох країнах. Терапевтична ефективність звичайних хіміотерапевтичних засобів обмежена їх високою токсичністю. Таким чином, для лікування пухлин важливою є розробка препаратів з низькою токсичністю. З розвитком нанотехнологій сконструйовані наноматеріали все ширше використовуються в біомедичних областях. Металофуллеренол гадолінію  $[Gd@C_{82}(OH)_{22}]_n$  є новим похідним фулерену, синтезованим Chen *et al.* в Інституті фізики високих енергій Китайської академії наук [18].

Наночастинки  $[Gd@C_{82}(OH)_{22}]_n$  є важливими похідними металофулерену з високою інгібуючою дією на різні види пухлин, такі як клітини MCF-7 і H22. Ці наночастинки можуть також подолати MDR пухлини та інгібувати метастази пухлини. Наночастинки  $[Gd@C_{82}(OH)_{22}]_n$  мають низьку токсичність і високу протипухлинну активність. Помітних пошкоджень важливих органів *in vivo* не виявлено. Цей результат свідчить про перевагу використання цих наночастинок у порівнянні з традиційними протипухлинними препаратами.

Досліджено протипухлинні механізми  $[Gd@C_{82}(OH)_{22}]_n$ . Виявлено кілька механізмів, що сприяють протипухлинній активності  $[Gd@C_{82}(OH)_{22}]_n$ . Механізми включають підвищення імунітету, зупинку фази G0 / G1, пригнічення ангиогенезу та антиоксидантну дію.

- Знищення пухлини шляхом нагрівання (гіпертермії)

Гіпертермія є одним із перспективних підходів у лікуванні раку. При гіпертермії використовуються різні методи, такі як гіпертермія всього тіла, радіочастотна гіпертермія, індуктивна гіпертермія за допомогою

мікрохвильової антени або імплантованих голок. Однак неминучою технічною проблемою гіпертермії є складність рівномірного прогрівання лише області пухлини до необхідної температури без пошкодження нормальної тканини.

З цієї причини деякі дослідники запропонували внутрішньоклітинну гіпертермію та розробили субмікронні магнітні частинки для гіпертермії. Ці магнітні частинки легко вбудовуються в клітини і виробляють тепло під змінним магнітним полем за рахунок втрат на гістерезис. Зокрема, колоїдний магнітний оксид заліза метаболізується та виводиться з організму, тому вони є ідеалізованим матеріалом. Також були розроблені «магнетит-катіонні ліпосоми» (MCL) для внутрішньоклітинної гіпертермії. MCL розроблені для покращення адсорбції та накопичення в пухлинних клітинах і демонструють у десять разів вищу спорідненість до пухлинних клітин, ніж нейтрально заряджені магнітоліпосоми. Це відбувається завдяки електростатичній взаємодії з негативно зарядженою клітинною мембраною.

Гіпертермічний ефект MCL у дослідженні *in vitro* досліджували за допомогою невеликих гранул клітин гліоми щурів. Клітини гліоми інкубували із середовищем, що містить MCL, і збирали у вигляді клітинної гранули, а потім прикладали змінне магнітне поле. Температура клітинної гранули підвищилася до понад 42°C, і після 40-хвилинного опромінення не залишилося життєздатних клітин.

Нарешті, спеціально розроблені MCL були використані для лікування *in vivo* солідних пухлин гіпертермією. Пухлинна тканина повністю зникла у багатьох щурів, підданих опроміненню магнітним полем, навіть якщо лікування проводилося шляхом простої ін'єкції MCL в одне місце. Коефіцієнт повної регресії збільшувався при повторному опроміненні. [19]

### 1.1.3 Інші застосування

#### 1) Тканинна інженерія

Біоміметичні процеси привернули величезну увагу в останні роки через їх значне застосування в біомедичних областях, таких як інженерія кісткової тканини. У дослідженні Ma *et al.* [20] біоміметичний процес був використаний для формування нанокристалічного апатитного покриття на металі. Тонкий шар апатиту, схожий на кістку, був нанесений на титан (Ti) після попередньої обробки лугом. Після цього відбулося занурення в імітовану рідину організму. Аналіз покриття за допомогою тонкоплівкової рентгенівської дифракції та скануючого електронного мікроскопа показав, що вирощений таким чином шар апатиту має наноструктуру та стехіометрію, подібну до природної кістки. Помічено, що товщина шару апатиту збільшується зі збільшенням періоду занурення. Дослідження поперечного перерізу також показало, що рівномірне покриття з карбонатвмісного апатиту (гідроксиapatиту) міцно приклеєне до металу Ti. Адгезія шару апатиту до підкладки Ti була додатково підтверджена випробуванням на зсув, яке показало середнє значення 9,5 МПа. Біоактивність покриття була остаточно досліджена за допомогою експериментів з культивування клітин. Результати показали, що нанокompозит, отриманий за даним способом, має хороші механічні властивості та біоактивність.

Титан (Ti) має привабливі властивості для матеріалів для відновлення кісток, такі як висока стійкість до руйнування, високе співвідношення міцності та ваги та висока пластичність, тому він вже широко використовується в областях ортопедії та стоматології. Однак також зазначається, що у Ti є недолік: він не проявляє здатності до склеювання кісток, що відома як біоактивність. Підвищення біоактивності Ti імплантатів було одним з основних напрямків досліджень останніх років. Спостерігаючи за межею розділу біологічно активних матеріалів із живою кісткою, зазначається, що на поверхнях матеріалу повинен бути шар апатиту, щоб він діяв як скріплююча поверхня. Так клітини можуть проліферувати та

диференціюватися, щоб виробляти колаген на цьому шарі апатиту. Далі навкружна кістка може вступити в безпосередній контакт з поверхневим апатитом і утворити міцні хімічні зв'язки.

## 2) Розділення та очищення біологічних молекул і клітин

Методи імунного мічення з використанням клітинно-специфічних антитіл, прямо або опосередковано зв'язаних з флуоресцентними барвниками або високомолекулярними комплексами, виявилися цінним засобом для ідентифікації та кількісної оцінки специфічних клітин у складних багатоклітинних системах та для вивчення розподілу мічених антигенів на клітинній поверхні та за допомогою світлової та електронної мікроскопії. Методи імунологічного мічення також застосовуються для поділу специфічних типів клітин. Клітини, мічені флуоресцентними антитілами або флуоресцентними імуномікросферами, були відокремлені від немічених клітин шляхом флуоресцентно-активованого сортування клітин. Зовсім недавно магнітні мікросфери, що складаються з феромагнітних колоїдних частинок, покритих метакрилатними сополімерами, були синтезовані та з'єднані з антитілами та іншими лігандами. Клітини, спеціально мічені цими реагентами, були відокремлені від немічених клітин на основі їх утримання в магнітних полях.

У статті [21] описано отримання стабільних частинок феромагнітного заліза, покритих декстраном, які мають високий магнітний момент у магнітному полі на відміну від описаних раніше залізо-декстранів. Ці феромагнітні частинки декстрану заліза були кон'юговані з білком А *Staphylococcus aureus* і використовувалися для специфічного мічення клітин для візуалізації антигенів клітинної поверхні за допомогою скануючої та трансмісійної електронної мікроскопії та для магнітного розділення специфічно мічених клітин.

## 3) Посилення контрасту МРТ

Weissleder et al. [22] було розроблено ультрамалий суперпарамагнітний препарат оксиду заліза (USPIO), досить малого розміру, щоб мігрувати через стінку капілярів, що є необхідною умовою при розробці лікарських препаратів для таргетних частинок. 70% частинок мали розмір менше 10 нм; 26% — менше 5 нм. Електронна мікроскопія продемонструвала, що частинки USPIO трансмігрують через стінку капілярів за допомогою везикулярного транспорту та через міжэндотеліальні з'єднання. Через 24 години після внутрішньовенного введення 3,6% введеної дози на грам тканини було виявлено в лімфатичних вузлах, 2,9% на грам у кістковому мозку, 6,3% на грам у печінці та 7,1% на грам у селезінці. Основні потенційні застосування USPIO: як внутрішньовенна контрастна речовина для лімфатичної системи, контрастна речовина для кісткового мозку, перфузійний агент тривалого періоду напіввиведення для мозку і серця і магнітна частина в організованих суперпарамагнітних контрастних речовинах для магнітно-резонансної томографії.

#### **1.1.4 Антимікробні властивості**

Останніми роками мікроорганізми набувають стійкості до широко використовуваних антибіотиків, і тому захворювання, викликані цими штамами, стають важковиліковними. Зі збільшенням обсягів досліджень у галузі нанотехнологій було знайдено, що кілька наноматеріалів мають антимікробні властивості. Наночастинки можуть вбивати або пригнічувати бактерії, грибки, дріжджі, а також віруси. Наночастинки також нетоксичні та стабільні, при цьому мають значну антимікробну активність, що робить їх перспективною альтернативою традиційним антибіотикам. Металеві наночастинки, такі як срібло, золото, магній тощо, дуже ефективно проявляють антимікробні властивості. Однак існують неметалічні наночастинки, такі як хітозан, кремнезем, сполуки вуглецю тощо, які демонструють вражаючу антимікробну дію.

Доведено, що наночастинки срібла ефективні проти штамів, стійких до антибіотиків. Також виявлено, що наночастинки золота ефективні проти багатьох штамів мікроорганізмів, головним чином бактерій і грибів. Було встановлено, що наночастинки золота мають дуже низьку токсичність щодо клітин людини, а також ефективні проти кількох патогенних штамів, що робить їх перспективною альтернативою як антимікробних агентів. Крім металічних наночастинок, наночастинки оксидів металів також виявляють антимікробну дію. Наночастинки діоксиду титану ( $\text{TiO}_2$ ) та оксиду магнію ( $\text{MgO}$ ) є одними з найбільш обговорюваних. Спосіб дії антимікробних властивостей металів і наночастинок оксиду металу пов'язаний з утворенням активних видів кисню (reactive oxygen species, ROS), а також з пошкодженням клітинної стінки або клітинної мембрани. Чим менший розмір наночастинок, тим більше їх відношення площі поверхні до об'єму, що покращує їх зв'язок із клітинними компонентами мікробної цитоплазми та клітинної стінки або клітинної мембрани.

Різні характеристики наночастинок срібла, такі як розмір, морфологія, електричний заряд, кристалічна структура, дзета-потенціал тощо, значно впливають на антибактеріальні властивості. На додаток до цього, також грають такі фактори, як штам мікроорганізму, що підлягає тестуванню, кількість мікроорганізмів, метаболічний стан мікроорганізму, умови навколишнього середовища, включаючи склад середовища, постачання киснем, швидкість дифузії AgNP, біодоступність AgNP тощо.

Найімовірнішим механізмом, за яким можуть функціонувати AgNP, є пряме пошкодження клітинної стінки та клітинної мембрани, поглинання вільних йонів  $\text{Ag}^+$  для пошкодження внутрішньоклітинного вмісту та окислювальний стрес, що призводить до утворення вільних радикалів (рис.1.6.).

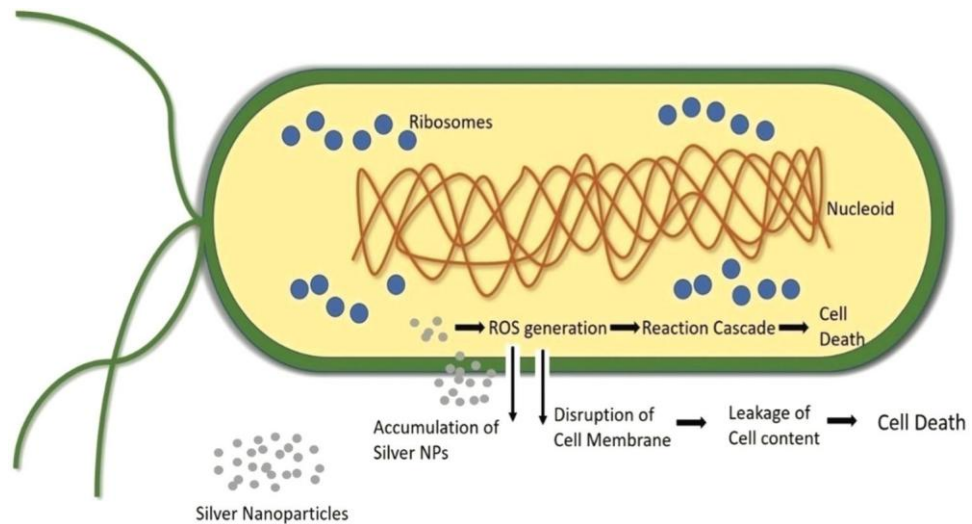


Рис. 1.6. Можливі шляхи пригнічення бактеріальної активності AgNP

Було помічено, що наночастинки виявляють різну адгезійну спорідненість з різними компонентами живих систем. Бактерії диференціюються на основі їх природи за Грамом, що включає відмінності в структурах, що прилягають до їх клітинної стінки. Помічено, що AgNP демонструють підвищений антибактеріальний потенціал проти грамнегативних бактерій порівняно з грампозитивними. Це пояснюється тим, що грампозитивні бактерії складаються з кількох шарів пептидогліканів, вбудованих тейхоєвою кислотою, що оточують клітинну мембрану, що є стеричною перешкодою для проникнення AgNP всередину бактеріальної клітини. Помічено, що AgNP зв'язуються з поверхнею бактеріальної клітини. Це пов'язано з силами притягання між мембраною бактеріальної клітини з негативним зарядом і AgNP з позитивним / граничним негативним зарядом. Цей тип взаємодії між бактеріальною клітиною та AgNP можна продемонструвати шляхом різкого зниження дзета-потенціалу на поверхні бактеріальної клітини залежно від природи бактерій за Грамом. Помічено, що ця взаємодія викликає морфологічні варіації наявних структур в клітинній мембрані бактерій, індукованих AgNP, що додатково спричиняє підвищення проникності клітинної мембрани, деполаризацію, згубний вплив на дихальний потенціал та порушення цілісності клітинної мембрани, що в

кінцевому підсумку спричиняє загибель бактерії. Витік клітинних складових, таких як білки, нуклеїнові кислоти, йони, ферменти та інші метаболіти, відбувається через підвищення проникності мембрани бактеріальної клітини з подальшим руйнуванням клітинної стінки. Таким чином, втрата цілісності клітинної стінки після приєднання наночастинок вважається початковим етапом, який відповідає за антимікробні властивості AgNP.

У разі оброблення клітин AgNPs спостерігається деформація клітинної мембрани (рис. 1.7.), а також дезорганізована клітинна мембрана. У цитоплазмі бактеріальної клітини утворилася область пустот через зміщення клітинної стінки та клітинної мембрани, як це видно з зображень TEM. Розмір клітини зменшується через витік клітинних компонентів, що призводить до загибелі клітини.

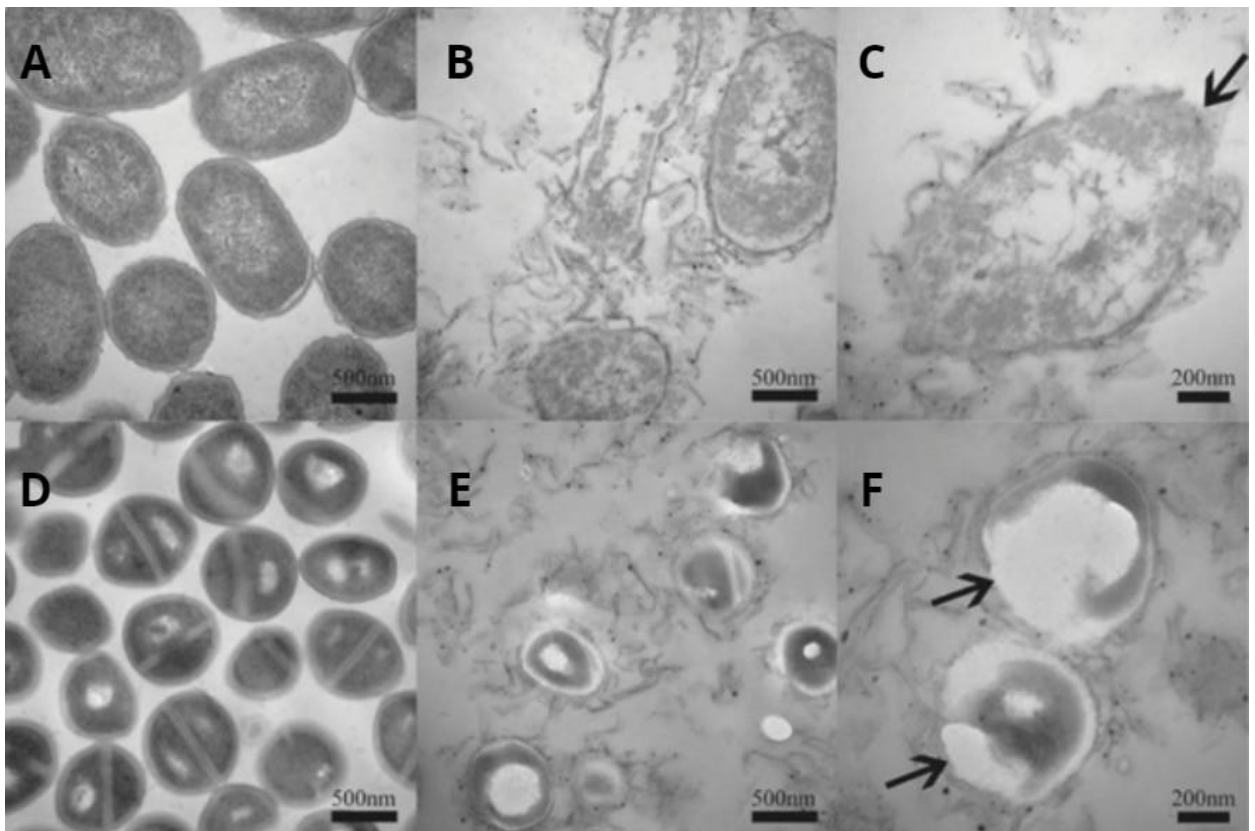


Рис.1.7. Зображення TEM, що представляють пошкодження мембрани клітин *E. coli* (B, C) і *S. aureus* (E, F) після впливу нанокompозиту з Ag, порівняно з необробленими клітинами в обох випадках (A, D). [23]

Можливий також варіант, що AgNP асоціюються з білками, присутніми на мембрані бактеріальної клітини, утворюючи комплекс AgNP-білок, який назавжди змінить структуру бактеріальної клітинної стінки. Асоціація йонів Ag<sup>+</sup> з тіоловими групами, присутніми в білках і ферментах, добре відома. Відома інактивація білка та ферментів, вбудованих у мембрану бактеріальної клітини, після асоціації йонів Ag<sup>+</sup> та функціональних груп, що містять сірку, присутніх у ферментах, а також у білках. [24]

## **1.2 Параметри наночастинок, що впливають на їх біологічні властивості**

Наночастинки металів (НЧ) – це колоїди, які демонструють унікальні оптичні властивості. Оптичні властивості НЧ визначаються локалізованим поверхневим плазмонним резонансом (LSPR). У плазмонних наночастинках електрони можуть спільно рухатися під дією електричного поля. Коли електричне поле коливається, електрони в наночастиці також коливаються, таким чином поглинаючи енергію електричного поля. Коли частота падаючої електромагнітної хвилі є резонансною для цих коливань, виникає LSPR. Він визначає резонансне поглинання енергії падаючої електромагнітної хвилі цієї частоти, яке називається смугою поглинання LSPR [25]. Залежно від розміру, матеріалу, форми та покриття наночастинки вона може мати одну або кілька смуг поглинання LSPR на різних частотах [26].

Найбільш згадуваною в літературі властивістю, що може впливати на їх фізичні властивості та біологічну активність, є розмір наночастинок. Резонансна довжина хвилі поглинання світла наночастинками залежить від їх розміру та форми [26, 27]. Коли наночастинки агрегують, їх розмір сильно змінюється, що призводить до так званого «блакитного зсуву» спектрів поглинання. Ця властивість наночастинок широко використовується для колориметричного детектування вірусів. Разом із поглинанням світла, наночастинки золота також розсіюють його специфічним чином. Внаслідок розсіювання поблизу наночастинок виникають ділянки з сильним локальним

електричним полем. Це ефект посилення локального поля, і він зазвичай відображається як відношення між локальним полем і полем падаючої хвилі, а його інтенсивність і геометрія значною мірою залежать від розміру та форми наночастинок [27], що схематично показано на Рис. 1. Коли дві або більше наночастинок розташовані досить близько, перерозподіл локального поля також є причиною сил притягання між наночастинами [28]. Інший момент — зв'язок між молярною концентрацією золота та концентрацією наночастинок у колоїді. У зразках з однаковою молярною концентрацією золота кількість наночастинок вища, якщо вони менші. Невеликий розмір і висока концентрація є причиною легкого проникнення наночастинок всередину клітини та їх високої токсичності [29]. Експериментально наведена залежність противірусної активності від форми наночастинок як для функціоналізованих [30], так і для нефункціоналізованих [31, 32] наночастинок. Vonnetmann *et al.* виявили, що функціоналізовані наночастинок золота є набагато кращими інгібіторами вірусу везикулярного стоматиту (VSV), ніж менші частинки [30]. Тоді як краще інгібування спостерігали у випадку менших нефункціоналізованих наночастинок у порівнянні з більшими [31, 32].

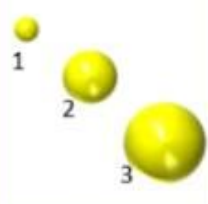
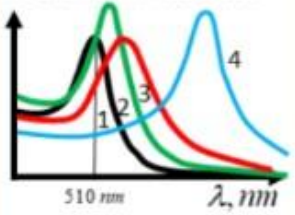

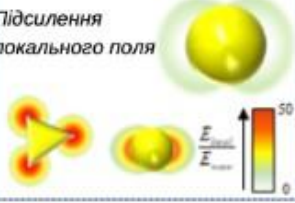
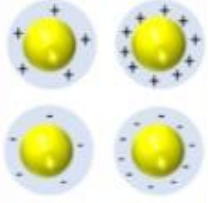
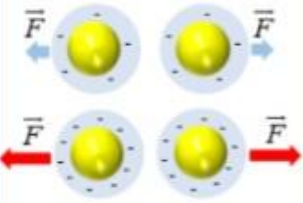


Властивість	Наслідки	Біологічний ефект
<b>Розмір</b> 	<b>Поглинання світла</b> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>поглинання клітиною в залежності від розміру;</li> <li>AuNPs 1–2 нм високотоксичні, 15 нм AuNPs відносно нетоксичні;</li> <li>менші нефункціоналізовані AuNPs кращі інгібітори вірусної активності.</li> </ul>
<b>Форма</b> 	<b>Підсилення локального поля</b> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>поглинання клітиною в залежності від форми;</li> <li>залежність цитотоксичності від форми;</li> <li>залежність антимікробної активності від форми.</li> </ul>
<b>Поверхневий заряд (дзета-потенціал)</b> 	<b>Електростатичні взаємодії</b> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>залежність поглинання клітиною та періоду напівжиття AuNPs від поверхневого заряду;</li> <li>залежність взаємодії між вірусом та наночастинкою від поверхневого заряду;</li> <li>залежний від поверхневого заряду біорозподіл AuNPs.</li> </ul>
<b>Хімія поверхні</b> 	<b>Специфічне зв'язування</b> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>золоті нанодропи можуть бути токсичними або ні до клітин шкіри людини в залежності від стабілізатора;</li> <li>AuNPs з сіаловою кислотою можуть хімічно зв'язуватись із білками вірусного капсиду;</li> <li>AuNPs, вкриті антитілами для детекції та візуалізації патогенів.</li> </ul>

Рис. 1.8. Фізико-хімічні властивості наночастинок золота та їх вплив на біологічні ефекти

Однак форма наночастинок може змінювати оптичні властивості наночастинок у ширшому діапазоні, ніж розмір [26]. Золоті нанодропи, нанооболонки та наноклітки мають резонанс LSPR у ближній інфрачервоній області, який, як відомо, передається в біологічних тканинах майже без поглинання [33]. Це є причиною їх широкого використання в біомедицині для візуалізації пухлин, фототермічної та фотодинамічної терапії [34]. Форма наночастинок також впливає на їх взаємодію з живими об'єктами. Лі та ін. показали, що клітинне поглинання стабілізованих хітозаном наночастинок золота клітинами карциноми гепатоцитів людини (HepG2) є найвищим для

золотих наносфер, за ними слідує золоті наностержні, а потім золоті нанозірки [35]. Подібний ефект був виявлений і для клітин ссавців [36, 37]. Цитотоксичність наночастинок у HepG2 була від найвищої: наностержні – нанозірки – наносфери [35]. Wang та ін. показали, що антибактеріальна активність наночастинок золота проти харчових бактеріальних патогенів залежить від форми наночастинок і є найвищою для золотих нанокубів, за якими йдуть золоті наносфери та золоті нанозірки [38]. Формозалежність антимікробних властивостей наночастинок золота була також показана Pedners *et al.* [39] та Irshad *et al.* [40]. Фізико-хімічні властивості наночастинок в основному визначаються методом їх синтезу і, у свою чергу, визначають їх біологічні ефекти.

### **1.3. Синтез наночастинок**

Наночастинки можуть складатися з різних елементів: метали, полімери, оксиди металів, кераміка (неорганічні неметалічні тверді частинки, синтезовані шляхом нагрівання та послідовного охолодження), карбон, органічні молекули, напівпровідники, ліпіди; і мають унікальні характеристики. Майже кожен метал можна використати для синтезу відповідних наночастинок. На основі методу синтезу наночастинки мають різні морфології, такі як сфери, стрижні, циліндри, дроти, ланцюжки, зірки, квіти, рифи, вуса, волокна, коробки тощо.

Наночастинки зазвичай складаються з трьох шарів:

- Поверхневий шар (surface layer), який може бути функціоналізований різноманітними малими молекулами, йонами металу, поверхнево-активними речовинами та полімерами
- Шар оболонки (shell layer), який хімічно відрізняється від ядра
- Ядро (the core), яке по суті є центральною частиною НЧ і зазвичай визначає їх основні властивості

У залежності від наявності поверхневого шару, ми можемо характеризувати наночастинки як функціоналізовані (покриті) або нефункціоналізовані (голі). [41]

Синтез наночастинок можна розділити на два основних підходи, а саме знизу вгору та зверху вниз. Метод «зверху вниз» полягає у розщепленні диспергованого матеріалу з утворенням аналогів у нанометровому масштабі. Це зменшення об'ємного матеріалу здійснюється головним чином фізичними методами, такими як: механічне подрібнення, розпилення, нанолітографія тощо; та хімічними методами, такими як термічний розклад. Тоді як у разі підходу знизу вгору окремі атоми та молекули додаються до утворення наночастинок. Золь-гель, осадження з пари, спінінг і біосинтез є одними з основних методів, заснованих на підході знизу вгору. Підхід знизу вгору є переважаючим для синтезу наноматеріалів у порівнянні з підходом зверху вниз, оскільки його легше масштабувати, він є економічно ефективним і продукт має однорідний склад. Синтез наночастинок можна умовно поділити на чотири основні етапи: нуклеація (зародження), ріст, затвердіння та агломерація.

Існує багато методів синтезу, за допомогою яких отримують як сухі частинки, так і наночастинки в рідкому колоїдному розчині. У біологічних дослідженнях, як *in vitro*, так і *in vivo*, здебільшого використовують наночастинки у рідкому колоїдному розчині, тому у цьому підрозділі розглянемо основні методи, що використовуються для синтезу наночастинок в біологічних експериментах. [42]

Реакції співосадження передбачають одночасне виникнення процесів нуклеації, росту, затвердіння та / або агломерації. Перевагами цього методу : [42] є його простота та швидкість, легкість контролю параметрів наночастинок та керування властивостями їх поверхні, енергоефективність та можливість реалізації за низької температури. Проте, його неможливо застосувати для синтезу наночастинок з будь-яких матеріалів та іноді

виникають проблеми з відтворюваністю властивостей від партії до партії. [42].

Синтез за допомогою мікрохвиль популярний у різних областях, починаючи від біохімії і закінчуючи нанотехнологіями. Хімічні реакції часто відбуваються швидше, ніж з традиційними методами конвекційного нагрівання, і мають високі виходи та меншу кількість побічних продуктів.

Мікрохвильові реактори забезпечують чудовий контроль над реакціями, витримують високі температури й тиск та демонструють відтворюваність від реакції до реакції. [43]

Ультразвук став важливим інструментом для синтезу наночастинок. При опроміненні рідини ультразвуком утворюється ультразвукова кавітація. Ультразвукова кавітація викликає різноманітні фізичні та хімічні ефекти, такі як високі температура, тиск і швидкість охолодження, що створює унікальне середовище для хімічних реакцій в екстремальних умовах. Ультразвук є витонченим методом для отримання наночастинок з контрольованою морфологією

- Синтез наночастинок за допомогою іскрового розряду є перспективним методом недорогого промислового виробництва сучасних наноматеріалів. [44] Цей метод дозволяє синтезувати дуже маленькі наночастинки діаметром менше 10 нм з металів, оксидів, напівпровідників та вуглецевих матеріалів, які характеризуються високою хімічною чистотою.

Зі збільшенням уваги до зеленої хімії стає все більш важливою розробка екологічно чистого, легкого методу синтезу наночастинок. Повідомляється, що шаблонний синтез є одним із найбільш перспективних методів отримання монодисперсних неорганічних наночастинок, в якому однорідні порожнини пористих матеріалів використовуються як укриття для утримання синтезованих наночастинок (рис. 1.4). Роль шаблону подвійна. По-перше, він дозволяє відтворити структуру з найкращою можливою

відтворюваністю і відіграє роль каркаса, щоб організувати різні функції пристрою, активних компонентів і різних інтерфейсів.

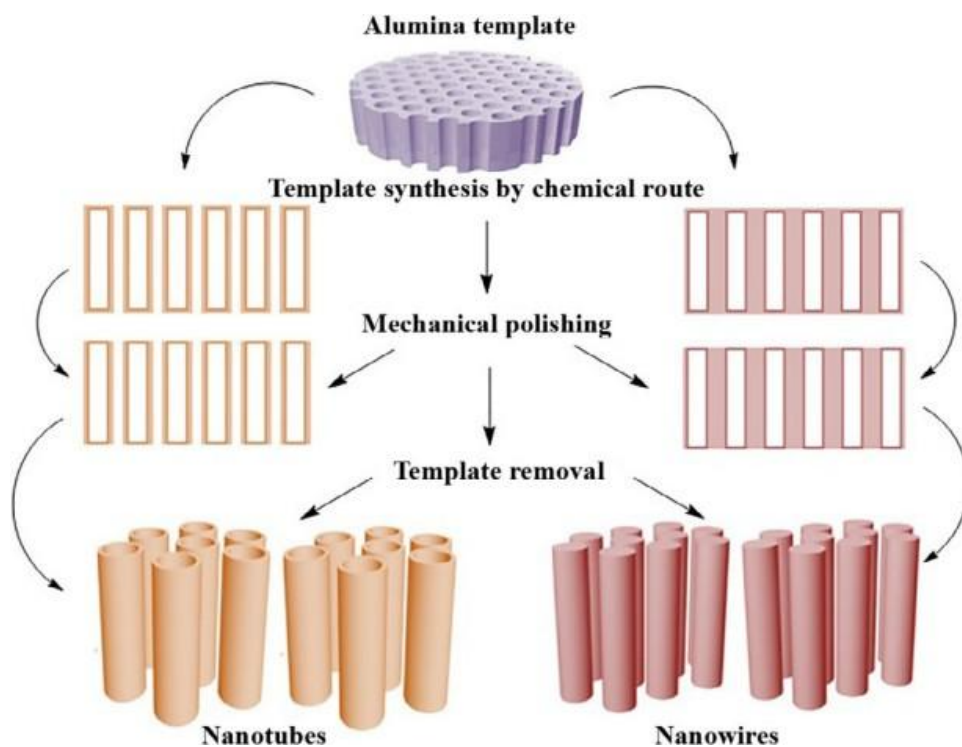


Рис. 1.4. Шаблонний синтез

Біологічний синтез наночастинок — це підхід зеленої хімії, який поєднує нанотехнології та біотехнології. Однак, незважаючи на стабільність, біологічні наночастинок не є монодисперсними і швидкість синтезу повільна. Концентрація синтезованих макромолекул або компонентів, які беруть участь у зародженні частинок, змінюється з часом і подовжує період зародження, що викликає полідисперсність наночастинок і подальше зниження швидкості синтезу. Щоб подолати ці проблеми, необхідно оптимізувати декілька методів, таких як методи культивування мікробів та методи екстракції, а також можна використовувати комбінаторний підхід, наприклад фотобіологічні методи. Для збільшення швидкості синтезу та покращення властивостей наночастинок слід детально вивчати клітинні, біохімічні та молекулярні механізми, що опосередковують синтез біологічних наночастинок. Через велике біорізноманіття рослин і мікробів, їх потенціал

як біологічних матеріалів для синтезу наночастинок ще не повністю вивчений [45].

Найпоширенішим підходом до синтезу наночастинок є хімічне відновлення за допомогою органічних і неорганічних відновників. Варто відзначити, що спектр речовин, що можуть бути використані для відновлення є дуже широким, через що існує багато протоколів синтезу наночастинок методом хімічного відновлення. Ідея цього методу полягає в наступному: відновники відновлюють йони срібла ( $\text{Ag}^+$ ) і призводять до утворення металевого срібла ( $\text{Ag}^0$ ), які формуються в олігомерні кластери. Ці кластери, як наслідок, формують наночастинки срібла. Важливо використовувати додаткові агенти для стабілізації наночастинок під час приготування наночастинок срібла, щоб запобігти агрегації наночастинок. Ці агенти часто називають стабілізаторами, їх молекули формують додатковий шар на поверхні наночастинок та надають тим самим їй поверхневий заряд. Такий поверхневий заряд призводить до появи електростатичного відштовхування між наночастинками, через що вони не можуть наблизитись достатньо для агрегації. [45]

## РОЗДІЛ II

### ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

#### 2. Постановка задачі, матеріали та методи

##### 2.1 Постановка задачі, вибір матеріалів та методів

За результатами проведеного у попередньому розділі аналізу, можна зробити висновок, що біологічна активність наночастинок значним чином визначається хімією їх поверхні. У випадку функціоналізованих наночастинок, властивості поверхні, яка є носієм біологічно активних молекул, визначається саме їх механізмом дії. Для «голих» наночастинок, хімія та фізика їх поверхні визначається використанням стабілізатором. Проте цікавим є той факт, що у багатьох роботах, присвячених вивченню біологічної активності наночастинок, на стабілізатор часто взагалі не звертають уваги, а робіт, присвячених вивченню впливу стабілізатора наночастинок на їх активність нами взагалі не було знайдено. Крім того, коли проводився огляд методів синтезу наночастинок, можна було помітити, що крім синтезу наночастинок як такого, важливим є питання забезпечення стабільності наночастинок та убезпечення їх від швидкого старіння. Часто при використанні наночастинок не звертають увагу на їх умови зберігання, через що іноді можна зустріти повідомлення про невідтворюваність біологічних експериментів з наночастинками. Тому в даній роботі було досліджено, чи впливає стабілізатор наночастинок та умови їх зберігання на їх біологічну активність.

Для цього було обрано перевірити біологічну активність наночастинок на прикладі їх взаємодії з бактеріями, адже як було зазначено вище, нефункціоналізовані наночастинокки мають виражену антимікробну активність. Було узгоджено взяти *Bacillus clausii* за модельний об'єкт, оскільки ця культура відносно безпечна та має широкий оптимум багатьох показників. *B. clausii* це Грам-позитивна рухлива спороформна

паличкоподібна бактерія. Колонії *B. clausii* мають обривчастий край, кремово-білий колір та кремову в'язку текстуру. [47]

У якості матеріалу наночастинок було обрано срібло, оскільки для вивчення антимікробної активності наночастинок срібло є одним з найчастіше використовуваних матеріалів, зокрема через власну антимікробну активність срібла як матеріалу, а також через широкі можливості методів синтезу та керування властивостями срібних наночастинок. Ще одним важливим фактором на користь наночастинок срібла є те, що вони проявляють плазмонні властивості, тож процеси старіння розчинів та їх взаємодії з середовищем відносно легко можна відстежувати за допомогою поглинальної спектроскопії у видимому діапазоні. У роботі було використано наночастинки, синтезовані методом хімічного відновлення, адже цей метод є одним з найпростіших та легко варіативних, тож дозволяє отримати наночастинки з різними стабілізаторами. Наночастинки не було синтезовано автором роботи, їх було замовлено відповідно до потреб експерименту.

Для перевірки антибактеріальної активності наночастинок було обрано техніку pour-over, у якій майже охолоджене поживне середовище заливалось у чашки Петрі на розчин наночастинок. Це виключає ймовірності реакції наночастинок на різке підвищення температури та забезпечує їх рівномірну дифузію. Для дослідження процесів старіння наночастинок за різних умов та їх взаємодії з бактеріальними препаратами у рідкому середовищі було обрано метод поглинальної спектроскопії у видимому діапазоні, адже як було зазначено вище наночастинки срібла мають пік LSPR у видимому діапазоні. У той же час бактеріальні препарати розсіюють видиме випромінювання, а інтенсивність цього розсіяння залежить від концентрації бактерій в препараті.

## **2.2. Отримання монокультури бактерій**

### **2.2.1 Підготовка щільного поживного середовища**

Середовище було надане ТОВ «Фармактив Україна» та містить пептон, порошок агару, хлорид калію та дріжджовий екстракт, тому воно може

забезпечувати бактерії основними поживними речовинами без селективної дії. рН середовища — 7,3 ( $\pm 0,2$ ) за 25°C. 28 г середовища було розчинено у 1 л дистильованої води, його кип'ятили 2–3 хвилини до повного розтоплення агару. Середовище охолоджують до приблизно 40°C. Далі середовище розливається у стерильні чашки Петрі та твердне під УФ-лампю для додаткової стерильності поверхні середовища.

### **2.2.2. Підготовка культури бактерій**

Спори були отримані з препарату «Ентерожерміна», Sanofi-Aventis, France. Спори були суспендовані у дистильованій воді, суміш нагрівали до температури тіла (36°C). Потім суспензію рівномірно розподіляли поверхнею щільного середовища стерильними ватними паличками. Чашки Петрі опечатували лабораторною плівкою Parafilm та відправляли у термостат для подальшої інкубації. Інкубація проводилась за таких умов:  $T = 37^\circ\text{C}$ ,  $t = 72$  години,  $P = 1$  атм.

### **2.2.3. Отримання монокультури**

Монокультура необхідна при вивченні росту та поведінки бактеріальних клітин; вона містить лише один тип (у нашому випадку, один штам) організму, так як уся колонія пішла від однієї материнської клітини. Для отримання монокультури чашки Петрі після інкубації екзаменуються на предмет поодиноких колоній. Одна із цих поодиноких колоній і стане матеріалом для подальшої культивування монокультури *B. clausii*.

### **2.2.4. Підготовка рідкого поживного середовища**

Процедура підготовки рідкого середовища LB дуже схожа на процес приготування твердого, єдина відмінність полягає у температурі: середовище не доводиться до кипіння, нагрівається лише до 45°C, щоб усі поживні речовини повністю розчинились. У цьому випадку агар-агар не встигає розплавитись, тому він просто осідає на дні стакану. Далі розчин

декантується та фільтрується методом вакуумної фільтрації через керамічний фільтр з порами в 50 нм.

### 2.2.5 Інокуляція середовища та інкубація

Так як LB вже підготовлене та стерильне, його інокують обраною колонією *B. clausii* мікробіологічною петлею. Колба опечатується лабораторною плівкою та поміщується в орбітальний шейкер для інкубації. Умови інкубації:  $T = 37^{\circ}\text{C}$ ,  $t = 48$  годин,  $P = 1$  атм.

### 2.3. Перевірка чутливості бактерій до наночастинок

Передусім, було проведене серійне розведення наночастинок за схемою, показаною на рис. 2.1.

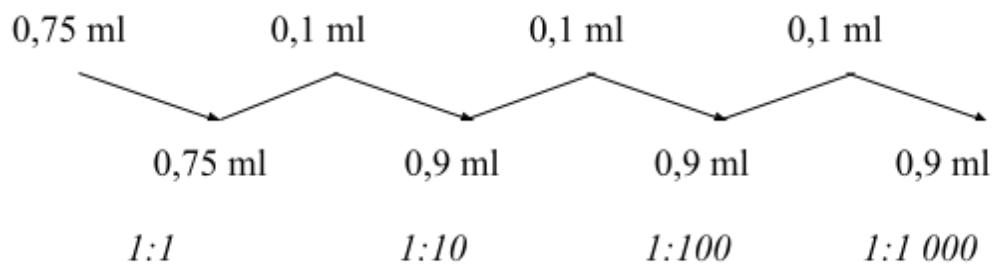


Рис. 2.1. Схема розведення наночастинок

Для подальшого дослідження було обрано щільне поживне середовище, підготовка якого була детально описана вище. Була застосована техніка pour-over: перед заливкою агару у стерильні чашки Петрі додавали 0.5 мл розчину наночастинок, після — заливали ще рідке середовище та залишали вистигати під УФ. Коли середовище повністю охоллоло, за допомогою мікропіпетки було додано 0.6 мл бактеріального бульйону, розведеного у дистильованій воді у співвідношенні 1:10. Далі чашки опечатуються та інкубуються 48 годин за  $T = 37^{\circ}\text{C}$ .

## **2.4. Дослідження оптичних властивостей наносистем та нанобіосистем**

Отриману раніше культуру бактерій *B.clausii* у середовищі LB в дистильованій воді в співвідношенні 1 об'єм бактеріального бульйону до 10 об'ємів води. Потім розчин потрапляє в контрольну кювету, де ще раз розводиться одним об'ємом води.

Початкова концентрація Ag в усіх зразках 0.1 мМ. Далі ми використовували чотири різні концентрації: 1 — початкова, 2 — 1:10, 3 — 1:100, 4 — 1:1000.

Кювети, підписані відповідно до концентрації та типу наночастинки, заповнюються 1 мл розчину бактерій (одна частина бульйону до 10 частин води) та 1 мл розчину наночастинок. Кювети опечатуються лабораторною плівкою та відправляються у UV / Vis спектрофотометр для першого вимірювання (time = 00)

Далі була проведена послідовність інкубації та вимірювань на таких позначках часу від початку експерименту: 15 хвилин, 30 хвилин, 45 хвилин, 105 хвилин, 165 хвилин та 24 години.

## **2.5 Параметри наночастинок**

Зразки наночастинок для експериментів були надані Інститутом хімії поверхні імені О.О. Чуйка. Наночастинки були синтезовані методом хімічного відновлення, або методом Туркевича [48, 49]. Основа для наночастинок — Ag; додецил сульфат натрію (SDS), цитрат натрію (Citr) та триптофан (Trp) використовувались як стабілізатори; середній розмір наночастинок — 10 нм. Спектри поглинання вихідних розчинів наночастинок представлені на рис. 2.1.

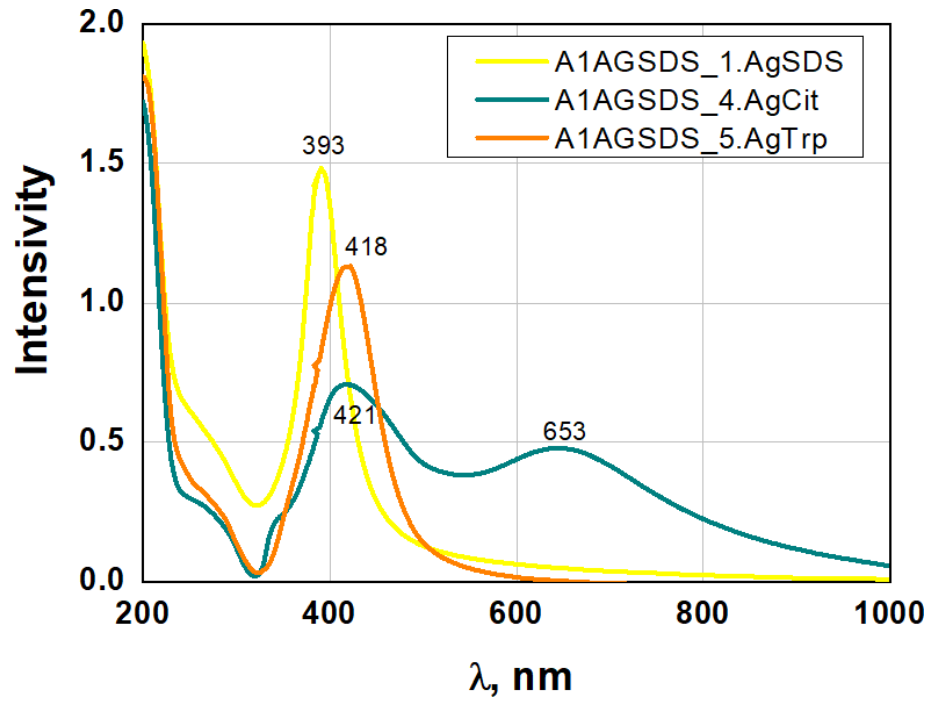


Рис. 2.1. Спектри поглинання світла наночастинками срібла з різними стабілізаторами

## РОЗДІЛ III

### РЕЗУЛЬТАТИ

#### **3.1. Тестування чутливості бактерій до наночастинок залежно від їх стабілізатора**

Після інкубації бактерій з наночастинками, ми спостерігали зниження інтенсивності росту бактерій (рис. 3.1–3.2). Можна помітити, що ріст бактерій пригнічується наночастинками як через 24, так і за 48 годин інкубації. Результати попередніх експериментів також показують, що наночастинки Ag, стабілізовані триптофаном з розведенням 1:10 за 48 годин інкубації, продемонстрували найкращу противірусну активність серед усіх досліджуваних зразків.

Цікавим експериментальним явищем є нелінійна залежність цієї дії від концентрації наночастинок. Слід зазначити, що подібна залежність раніше спостерігалася для противірусної активності нефункціоналізованих наночастинок благородних металів. Можна побачити, що рівень пригнічення активності бактерій за 48 годин є більшим, ніж за 24 години. Це цікавий експериментальний факт, адже як відомо, при використанні антибіотиків важливим є їх регулярне використання. Можемо бачити, що наночастинки демонструють пролонговану антибактеріальну активність...

Якщо проаналізувати залежність наночастинок від стабілізатора, то можна помітити, що здебільшого найкраще пригнічення спостерігалось в експериментах з наночастинками, стабілізованими триптофаном. Це може пояснюватись відносно високою біодоступністю наночастинок, оскільки стабілізатор – звичайна амінокислота. Проте, на рис. 3.1 можна помітити, що в розведенні 1:10 активність наночастинок, стабілізованих SDS є значно вищою. Це може бути пов'язане з токсичністю самого матеріалу стабілізатора. [50]

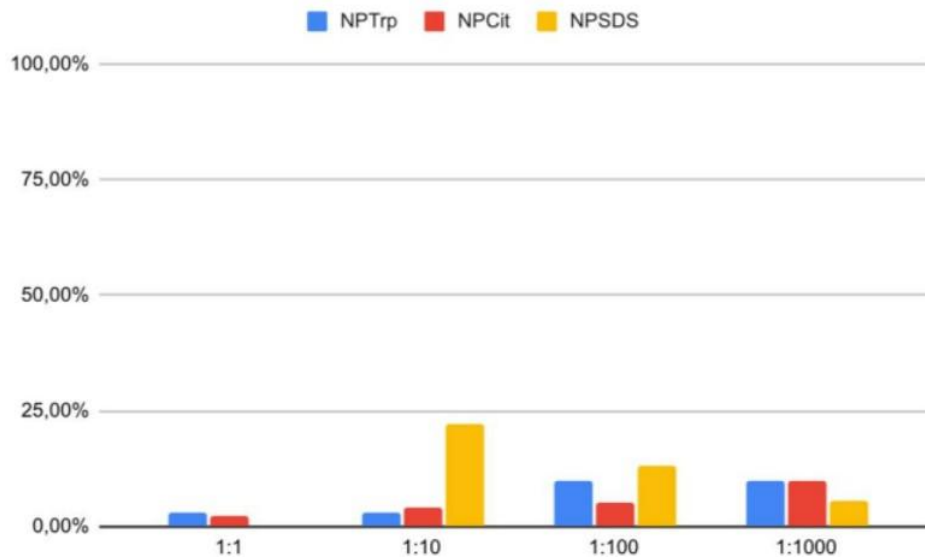


Рис. 3.1. Зниження бактеріальної активності після інкубації з AgNP протягом 24 годин (релевантна різниця у порівнянні до інтактних бактерій)

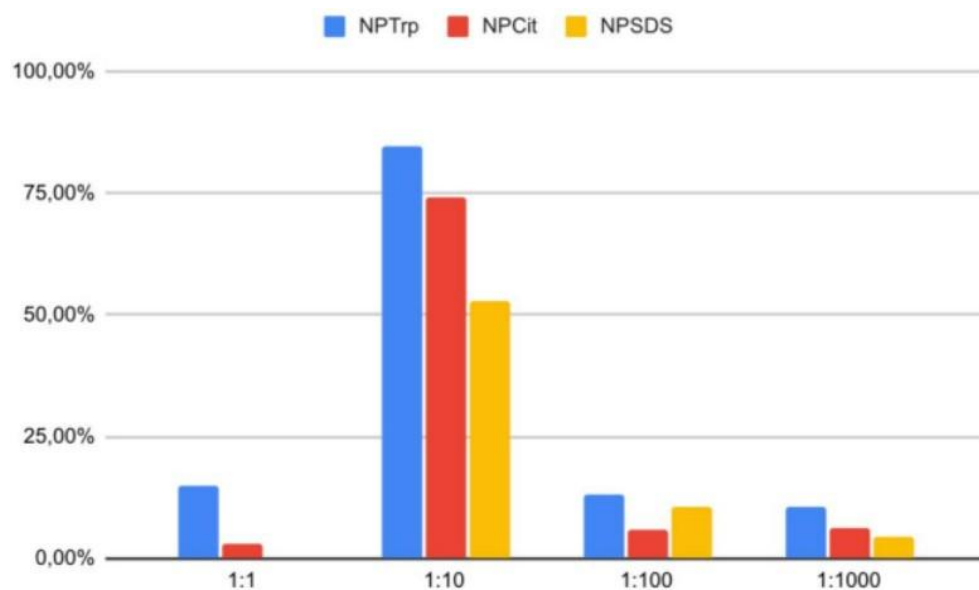


Рис. 3.2. Зниження бактеріальної активності після інкубації з AgNP протягом 48 годин (релевантна різниця у порівнянні до інтактних бактерій)

Такий само експеримент був проведений для наночастинок, які зберігалися в холодильнику при температурі 4°C протягом 3 діб. У цьому комплексі експериментів не спостерігалось значної антибактеріальної активності в усіх досліджуваних зразках. Це стало цікавим явищем, яке вказує на те, що умови зберігання розчинів наночастинок можуть відігравати

значну роль у стабільності наночастинок, а отже, у формуванні їх біологічних властивостей, частково антибактеріальних властивостей. Оскільки наночастинок широко використовуються для модифікації поверхонь деяких біоелектронних пристроїв, можна зробити висновок, що необхідно враховувати умови зберігання наночастинок. Результати дослідження фізичних властивостей наночастинок залежно від умов зберігання та теоретичного розгляду явищ представлені у наступних абзацах.

### **3.2. Властивості наночастинок за різних умов зберігання**

З метою вивчення впливу умов зберігання (матеріалу посуду та температури) ми вимірювали спектри поглинання наночастинок у пластикових і скляних кюветах при різних розведеннях в умовах нагрівання (до 42°C) та охолодження (нижче до 10°C) протягом трьох днів при кожній температурі. Після цього наночастинок поміщали в кімнатні умови і через три дні знову вимірювали їх спектри поглинання.

Результати вимірювань показали, що для температур від 15°C до 42°C суттєвих змін у спектрах наночастинок не спостерігалось ні за 3 дні, ні довше (наприклад, показані результати для наночастинок, стабілізованих триптофаном і зберігаються в скляних кюветах при 15°C на рис. 3.3). На цьому етапі також можна зробити один істотний висновок, що при нагріванні наночастинок до температур біологічних живих тканин не відбувається змін у їх фізико-хімічних властивостях.

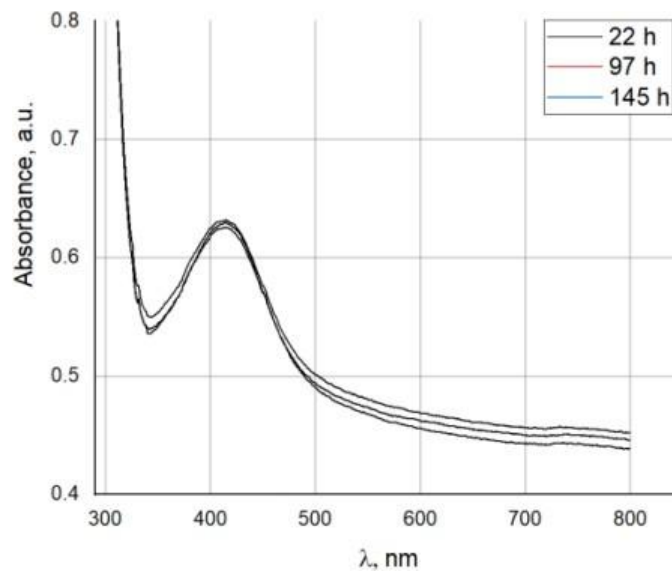


Рис. 3.3. Спектр поглинання AgNP стабілізованих триптофаном у скляній кюветі за  $T = 15^{\circ}\text{C}$

Результати вимірювань показують, що охолодження наночастинок необоротно змінює їх властивості і, швидше за все, призводить до їх агрегації на поверхні скляної кювети. При цьому зміни вимірювань у пластиковому посуді були не такими значними.

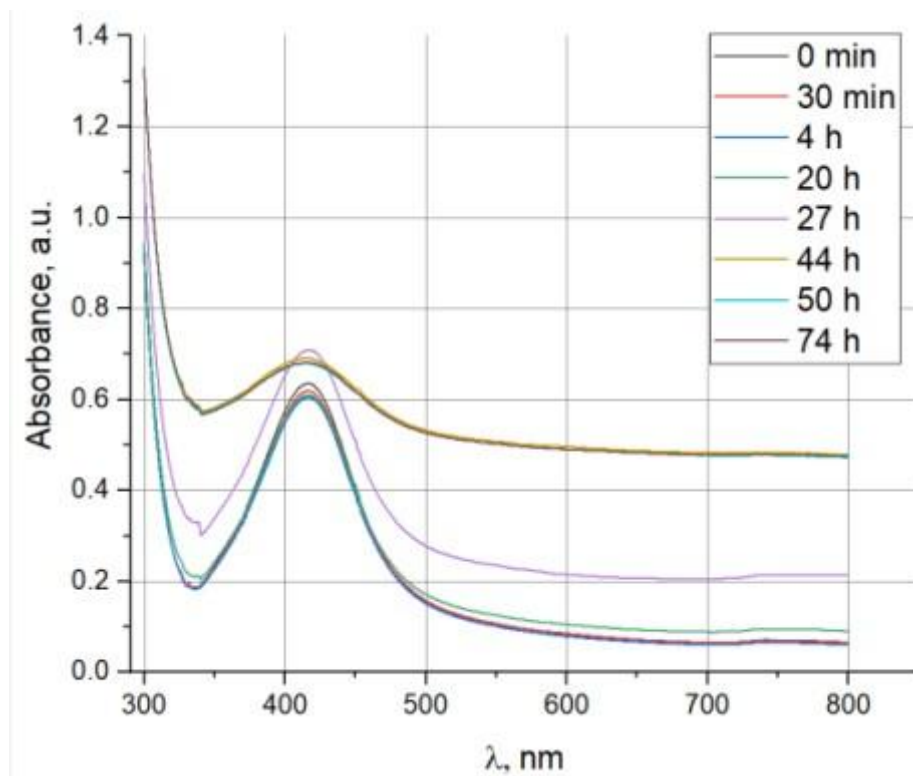


Рис. 3.4. Спектр поглинання AgNP стабілізованих триптофаном у скляній кюветі за  $T = 10^{\circ}\text{C}$

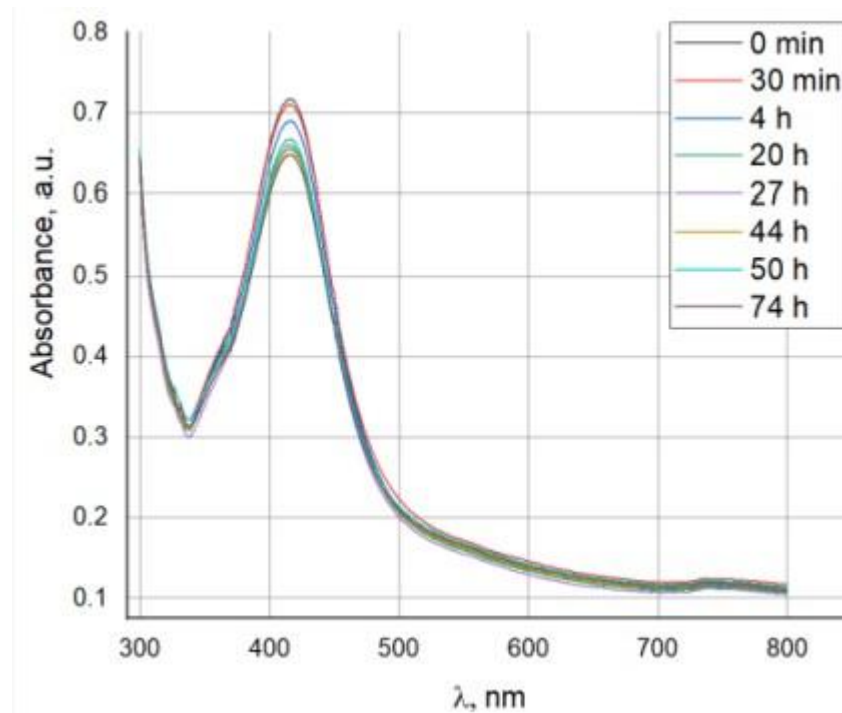


Рис. 3.5. Спектр поглинання AgNP стабілізованих триптофаном у пластиковій кюветі за  $T = 10^{\circ}\text{C}$

Так чому ж охолодження в склі може впливати на оптичні властивості наночастинок і змінювати їх біологічні властивості? Ці зміни можуть бути викликані агрегацією наночастинок одна на іншу або агрегацією наночастинок на поверхні кювети. Обидва процеси відбуваються внаслідок взаємодії в колоїдах. Відповідно до теорії DLVO (Дерягіна–Ландау–Вервея–Овербека) [51] взаємодії в основному визначаються двома силами: силою Ван-дер-Ваальса та силою відштовхування, викликаною зарядженим подвійним шаром навколо наночастинок.

У такій системі можна спостерігати енергетичний бар'єр, який запобігає агрегації наночастинок. Також істотну роль дзета-потенціалу в стабільності колоїду можна побачити на рис. 3.6: для низьких значень дзета-потенціалу може не бути енергетичного бар'єру.

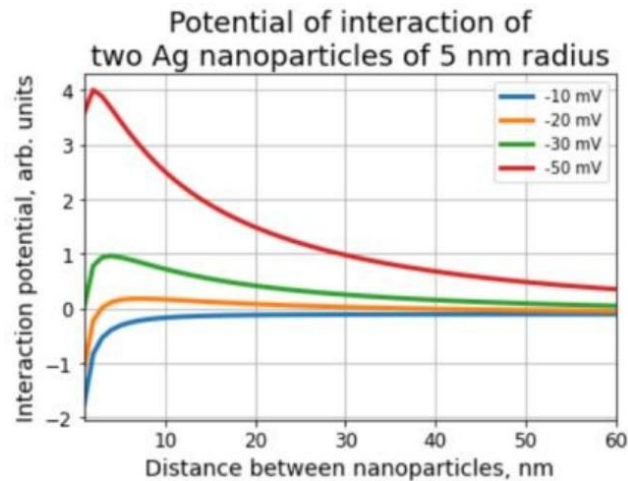


Рис. 3.6. Потенціал взаємодії між двома AgNP у колоїдному розчині за 300 К.

Зі зниженням температури ймовірність перетину бар'єру зменшується, що має призвести до кращої стабільності наночастинок. Проте, взаємодія подвійного зарядженого шару залежить від температури, тому форма потенціалу взаємодії також повинна змінюватися. Тож зниження температури може призводити до зменшення (або навіть зникнення) потенціального бар'єру. Тому зі зниженням температури зменшуються і бар'єр, і ймовірність його подолання.

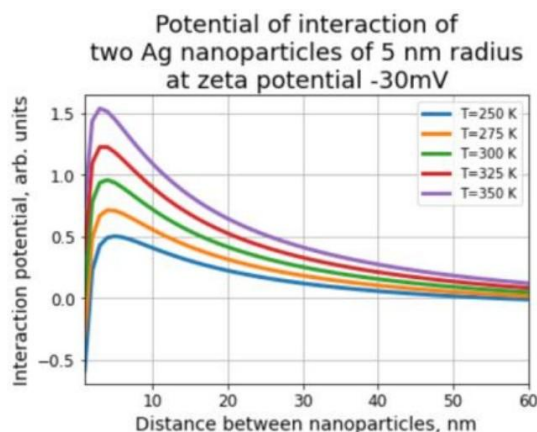


Рис. 3.7. Потенціал взаємодії між двома AgNP у колоїдному розчині за різних температур

Розглянемо також, чому матеріал посуду може впливати на стабільність наночастинок. Важливою властивістю взаємодіючих об'єктів є константа Гамакера, яка визначає інтенсивність притягальних взаємодій Ван-дер-Ваальса. Для різних видів скла, зокрема у воді, ця константа може бути на один-два порядки вищою за постійну Гамакера для наночастинок. Тому це може підвищити ймовірність агрегації наночастинок на стінках кювети. Для скла з константою Гамакера вищою за константу Гамакера  $A_g$  і значно нижчим ( $-10$  мВ) дзета-потенціалом ймовірність адсорбції наночастинок на поверхні буде дуже високою. Звичайно, в цій ситуації константа агрегації повинна значно збільшитися (рис. 3.8., б). Таким чином, бачимо, що для деяких типів скла можлива агрегація наночастинок на його поверхні, ймовірність якої зростає зі зниженням температури.

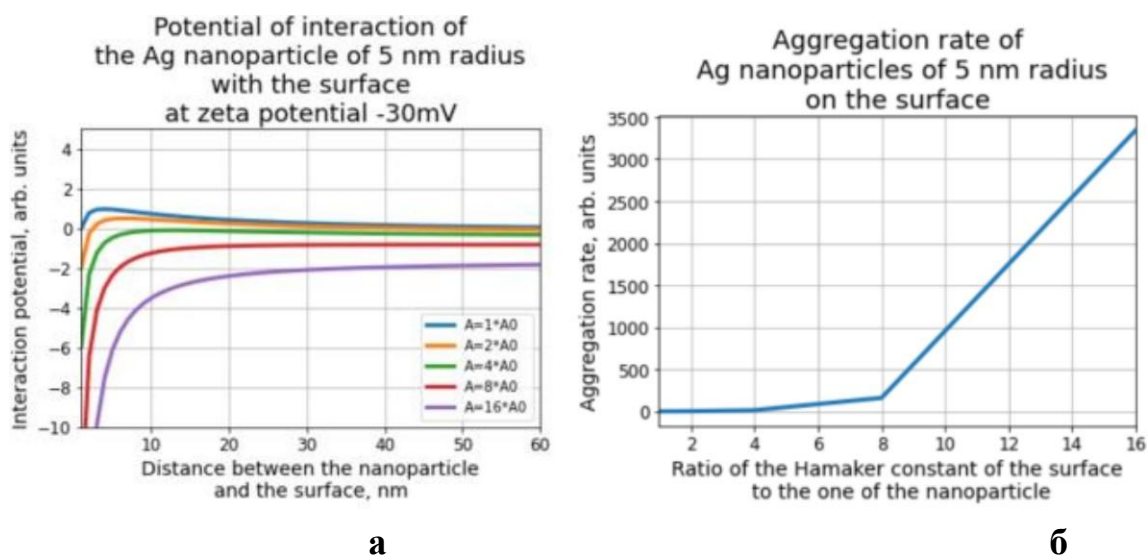


Рис. 3.8. Потенціал взаємодії між AgNP та скляною поверхнею з різними значеннями константи Гамакера (а) та швидкість агрегації наночастинок на скляній поверхні з різними значеннями константи Гамакера (б)

Чому ж тоді такий результат спостерігався лише для скла? По-перше, для багатьох видів пластику константа Гамакера порівнювана з її значеннями для наночастинок; по-друге, дзета-потенціал таких поверхонь становить від  $-50$  мВ і може досягати  $-90$  мВ. З рис. 7 видно, що зменшення дзета-потенціалу значно збільшує потенціальний бар'єр в системі. Тому

пластик матиме дуже високий потенціальний бар'єр в системі, а отже, ймовірність агрегації буде значно нижчою.

### 3.3. Оптичні властивості нанобіосистем

Спочатку розглянемо оптичні властивості інтактних бактерій (рис. 3.9). Видно, що інтактні бактерії живуть і ростуть у зразку в присутності поживного середовища. Через 24 години інкубації можна спостерігати збільшення поглинання. Отже, можна зробити висновок, що три піки на довжинах хвиль нижче 450 нм відповідають поглинанню чистих бактерій.

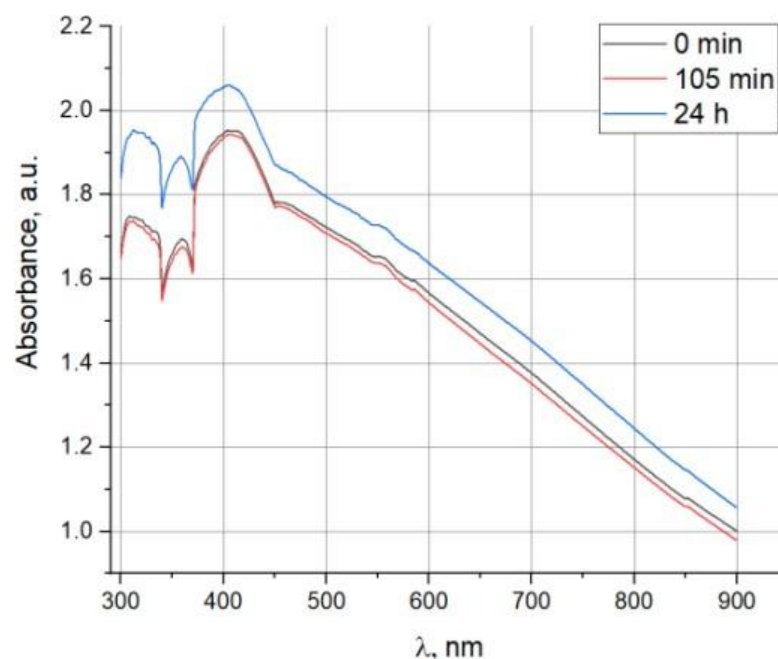


Рис. 3.9. Спектр поглинання інтактних бактерій

У разі інкубації бактерій з наночастинками з різними стабілізаторами (рис. 3.10 а, б, в) видно, що на зазначених довжинах хвилі збільшення поглинання не спостерігається. Оскільки наночастинки пригнічують активність бактерій, очевидно, що поглинання світла бактеріями має бути нижчим.

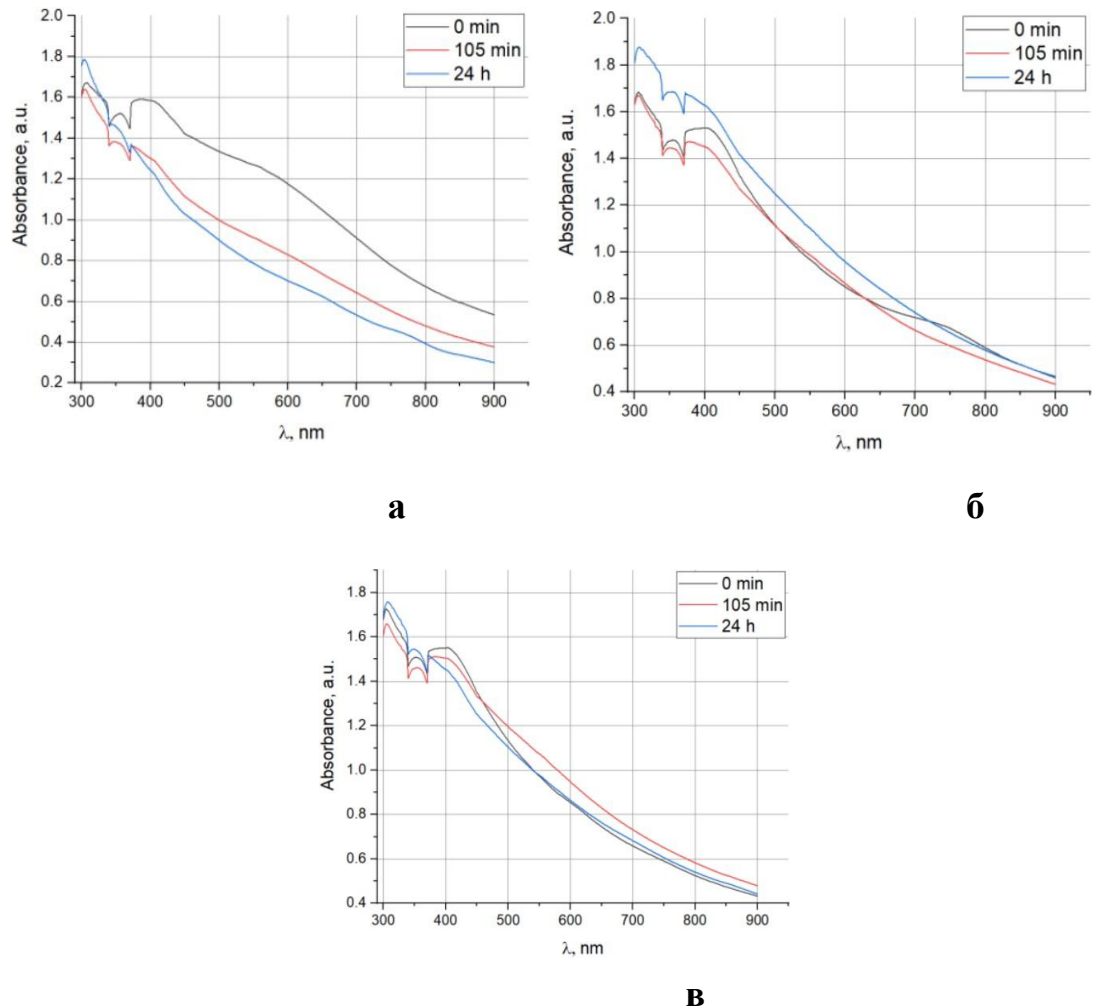


Рис. 3.10. Спектр поглинання системи бактерії + AgNP, стабілізованих а — додецил сульфатом натрію, б — цитратом натрію, в — триптофаном

На рис. 3.11 видно, що оптичні властивості бактерій, інкубованих з AgNP, чутливі до концентрації наночастинок (залежність нелінійна). Зауважимо, що у всіх досліджених випадках концентрація бактерій досить висока, тому пік поглинання світла наночастинками неможливо визначити на всіх спектрах. Це означає, що оскільки взаємодія в досліджуваних системах залежить від концентрації, цю властивість також можна оцінити за допомогою видимих спектрів.

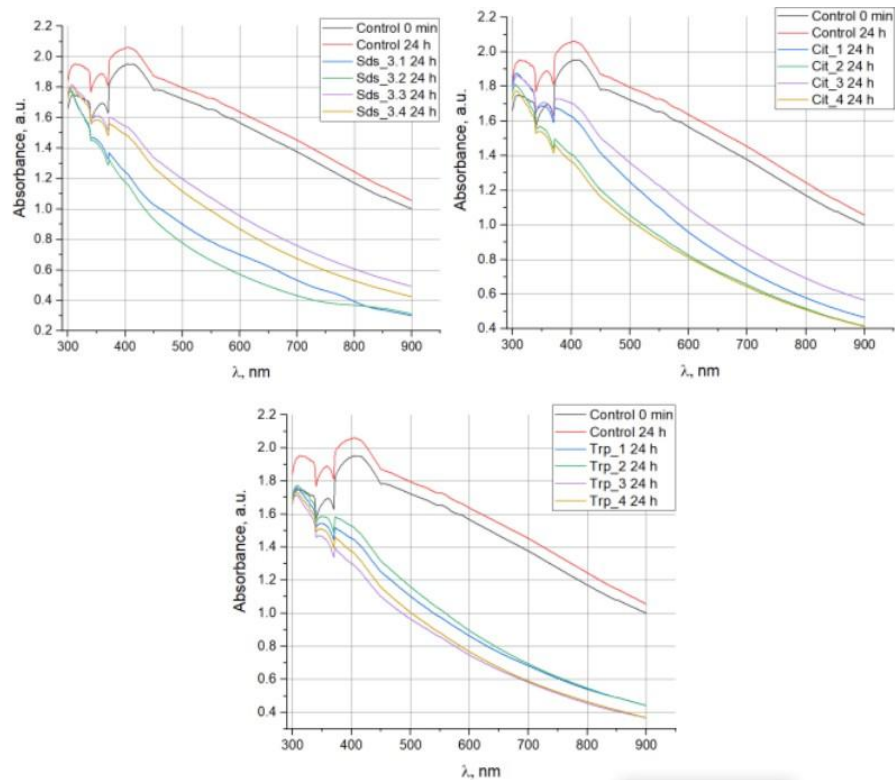


Рис. 3.11. Спектр поглинання бактерій, інкубованих з AgNP з різними стабілізаторами за різних концентрацій наночастинок.

Якщо в експерименті використовувати нижчу концентрацію бактерій, то абсорбція бактерій буде набагато нижчою, ніж у наночастинок, результати свідчать (приклад для наночастинок, стабілізованих триптофаном на рис. 3.12), що концентрація ізольованих наночастинок у розчині зменшується з часом. Очевидно, це пов'язано з адсорбцією наночастинок на поверхні бактерій або проникненням всередину бактерій.

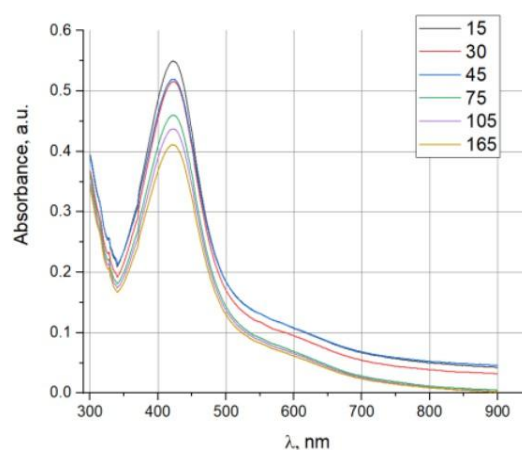


Рис. 3.12. Спектр поглинання бактерій, інкубованих з AgTrp

## ВИСНОВКИ

У роботі проведено експериментальне та теоретичне дослідження біологічної активності наночастинок срібла на прикладі їх антибактеріальної активності залежно від стабілізатора та умов зберігання наночастинок.

Було показано на прикладі наночастинок срібла та бактерій *Bacillus clausii*, що наночастинки демонструють пролонгований ефект пригнічення бактеріальної активності протягом 48 годин без їх додаткового введення. Також показано, що антибактеріальна активність нефункціоналізованих наночастинок срібла залежить від використаного стабілізатора. Це пояснюється тим, що стабілізатор визначає фізичні та хімічні властивості поверхні наночастинок, а властивості поверхні визначають взаємодію наночастинок з біооб'єктами. Серед використаних стабілізаторів найкращу ефективність продемонстрував триптофан, який можна рекомендувати для використання у подальших біологічних дослідженнях. Також з отриманих результатів можна зробити висновок, що при проведенні біологічних експериментів з наночастинками важливо звертати увагу на метод їх синтезу та використаний стабілізатор.

Дослідження оптичних властивостей наносистем та біонаносистем на прикладі бактерій *Bacillus clausii* з наночастинками показало, що вимірювання видимих спектрів поглинання розчинів бактерій у поживному середовищі з наночастинками може бути використано для вивчення взаємодій у біонаносистемах. Результати також свідчать про те, що такі вимірювання є занадто чутливими і відображають вплив стабілізатора наночастинок та їх концентрації. Також було показано, що поєднуючи вимірювання розчинів з різними концентраціями бактерій, можна окремо оцінити зміни, що відбуваються в бактеріях і в наночастинках.

Також було показано, що умови зберігання сильно впливають на фізико-хімічні властивості і, як наслідок, на біологічну активність наночастинок. На основі отриманих результатів можна рекомендувати

використовувати пластиковий посуд для зберігання наночастинок, а також уникати низьких температур.

Були отримані й цікаві результати, які потребують подальшого вивчення. По-перше, кореляція між концентрацією наночастинок та їх антимікробною дією є нелінійною. Крім того, різні типи НЧ мають свою ефективну концентрацію. По-друге, наночастинки, стабілізовані цитратом, змінили свій колір після інкубації з бактеріями. Це є завданнями для подальших досліджень.

### Список використаних джерел

- [1] E. Domingo and J. J. Holland, “RNA virus mutations and fitness for survival,” *Annual Review of Microbiology*, vol. 51, no. 1, pp. 151–178, 1997.
- [2] S. X. Wang, J. Michiels, K. K. Ariën, R. New, G. Vanham, and I. Roitt, “Inhibition of HIV virus by neutralizing VHH attached to dual-functional liposomes encapsulating Dapivirine,” *Nanoscale Research Letters*, vol. 11, no. 1, 2016.
- [3] C. L. Ventola, “The antibiotic resistance crisis: Part 1: Causes and threats,” *P & T: a peer-reviewed journal for formulary management*, Apr-2015. [Online]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25859123/>. [Accessed: 15-Jun-2022].
- [4] A. Bartholomeusz and S. A. Locarnini, “Antiviral drug resistance: Clinical consequences and molecular aspects,” *Seminars in Liver Disease*, vol. 26, no. 2, pp. 162–170, 2006.
- [5] F. G. Hayden, “Antiviral resistance in influenza viruses — implications for management and pandemic response,” *New England Journal of Medicine*, vol. 354, no. 8, pp. 785–788, 2006.
- [6] L. Menéndez-Arias, “Molecular basis of human immunodeficiency virus type 1 drug resistance: Overview and recent developments,” *Antiviral Research*, vol. 98, no. 1, pp. 93–120, 2013.
- [7] P. A. Guinée, “Bacterial drug resistance in Animals,” *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 182, no. 1 The Problems, pp. 40–51, 1971.
- [8] D. C. Hooper and G. A. Jacoby, “Mechanisms of drug resistance: Quinolone resistance,” *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1354, no. 1, pp. 12–31, 2015.
- [9] D. Gupta, A. Singh, and A. U. Khan, “Nanoparticles as efflux pump and biofilm inhibitor to rejuvenate bactericidal effect of conventional antibiotics,” *Nanoscale Research Letters*, vol. 12, no. 1, 2017.
- [10] R. Tardugno, G. Giancotti, T. De Burghgraeve, L. Delang, J. Neyts, P. Leyssen, A. Brancale, and M. Bassetto, “Design, synthesis and evaluation against

chikungunya virus of novel small-molecule antiviral agents,” *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, vol. 26, no. 4, pp. 869–874, 2018.

[11] G. Scott, “A study of the Lycurgus Cup”, *J Glass Studies* vol. 37, pp. 51–64, 1995.

[12] M. Bruchez, M. Moronne, P. Gin, S. Weiss, and A. P. Alivisatos, “Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels,” *Science*, vol. 281, no. 5385, pp. 2013–2016, 1998.

[13] R. L. Edelstein, C. R. Tamanaha, P. E. Sheehan, M. M. Miller, D. R. Baselt, L. J. Whitman, and R. J. Colton, *The BARC biosensor applied to the detection of biological warfare agents*. United States: Naval research lab Washington DC, 2000.

[14] J.-M. Nam, C. S. Thaxton, and C. A. Mirkin, “Nanoparticle-based Bio-Bar codes for the ultrasensitive detection of proteins,” *Science*, vol. 301, no. 5641, pp. 1884–1886, 2003.

[15] R. Mahtab, J. P. Rogers, and C. J. Murphy, “Protein-sized quantum dot luminescence can distinguish between ‘straight’, ‘bent’, and ‘kinked’ oligonucleotides,” *Journal of the American Chemical Society*, vol. 117, no. 35, pp. 9099–9100, 1995.

[16] W. J. Parak, R. Boudreau, M. Le Gros, D. Gerion, D. Zanchet, C. M. Micheel, S. C. Williams, A. P. Alivisatos, and C. Larabell, “Cell motility and metastatic potential studies based on quantum dot imaging of Phagokinetic Tracks,” *Advanced Materials*, vol. 14, no. 12, p. 882, 2002.

[17] C. Mah, I. Zolotukhin, T. J. Fraites, J. Dobson, C. Batich, and B. J. Byrne, “DNA virus vectors iii: Aav, HSV, and other,” *Molecular Therapy*, vol. 1, no. 5, pp. 239–242, May 2000.

[18] C. Chen, G. Xing, J. Wang, Y. Zhao, B. Li, J. Tang, G. Jia, T. Wang, J. Sun, L. Xing, H. Yuan, Y. Gao, H. Meng, Z. Chen, F. Zhao, Z. Chai, and X. Fang, “Multihydroxylated [gd@c82(oh)22]*n* nanoparticles: antineoplastic activity of high efficiency and low toxicity,” *Nano Letters*, vol. 5, no. 10, pp. 2050–2057, 2005.

- [19] M. Shinkai, M. Yanase, M. Suzuki, H. Honda, T. Wakabayashi, J. Yoshida, and T. Kobayashi, "Intracellular hyperthermia for cancer using magnetite cationic liposomes," *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, vol. 194, no. 1-3, pp. 176–184, 1999.
- [20] J. Ma, H. Wong, L. B. Kong, and K. W. Peng, "IOPscience," *Nanotechnology*, 15-Apr-2003. [Online]. Available: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/0957-4484/14/6/310>. [Accessed: 15-Jun-2022].
- [21] R. S. Molday and D. Mackenzie, "Immunospecific ferromagnetic iron-dextran reagents for the labeling and magnetic separation of cells," *Journal of Immunological Methods*, 12-Nov-2002. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0022175982900072>. [Accessed: 16-Jun-2022].
- [22] R. Weissleder, G. Elizondo, J. Wittenberg, C. A. Rabito, H. H. Bengel, and L. Josephson, "Ultrasmall superparamagnetic iron oxide: Characterization of a new class of contrast agents for MR Imaging.," *Radiology*, vol. 175, no. 2, pp. 489–493, 1990.
- [23] R. Zhao, M. Lv, Y. Li, M. Sun, W. Kong, L. Wang, S. Song, C. Fan, L. Jia, S. Qiu, Y. Sun, H. Song, and R. Hao, "Stable nanocomposite based on pegylated and silver nanoparticles loaded graphene oxide for long-term antibacterial activity," *ACS Applied Materials & Interfaces*, vol. 9, no. 18, pp. 15328–15341, 2017.
- [24] S. Gharpure, A. Akash, and B. Ankamwar, "A review on antimicrobial properties of metal nanoparticles," *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, vol. 20, no. 6, pp. 3303–3339, 2020.
- [25] E. Hutter and J. H. Fendler, "Exploitation of localized surface plasmon resonance," *Advanced Materials*, vol. 16, no. 19, pp. 1685–1706, 2004.
- [26] K.-S. Lee and M. A. El-Sayed, "Gold and silver nanoparticles in sensing and imaging: sensitivity of plasmon response to size, shape, and metal composition," *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 110, no. 39, pp. 19220–19225, 2006.

- [27] K. L. Kelly, E. Coronado, L. L. Zhao, and G. C. Schatz, "The optical properties of metal nanoparticles: the influence of size, shape, and dielectric environment," *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 107, no. 3, pp. 668–677, 2002.
- [28] W. Rechberger, A. Hohenau, A. Leitner, J. R. Krenn, B. Lamprecht, and F. R. Aussenegg, "Optical properties of two interacting gold nanoparticles," *Optics Communications*, vol. 220, no. 1-3, pp. 137–141, 2003.
- [29] Y. Pan, S. Neuss, A. Leifert, M. Fischler, F. Wen, U. Simon, G. Schmid, W. Brandau, and W. Jahnen-Dechent, "Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles," *Small*, vol. 3, no. 11, pp. 1941–1949, 2007.
- [30] J. Vonnemann, C. Sieben, C. Wolff, K. Ludwig, C. Böttcher, A. Herrmann, and R. Haag, "Virus inhibition induced by polyvalent nanoparticles of different sizes," *Nanoscale*, vol. 6, no. 4, p. 2353, 2014.
- [31] E. Paradowska, M. Studzińska, A. Jabłońska, V. Lozovski, N. Rusinchuk, I. Mukha, N. Vitiuk, and Z. J. Leśnikowski, "Antiviral effect of nonfunctionalized gold nanoparticles against herpes simplex virus type-1 (HSV-1) and possible contribution of near-field interaction mechanism," *Molecules*, vol. 26, no. 19, p. 5960, 2021.
- [32] V. Lysenko and M. Spivak, "Nanophysics and antiviral therapy," *Ukrainian Journal of Physics*, vol. 58, no. 1, pp. 77–90, 2013.
- [33] F. F. Jöbsis-vanderVliet, "Discovery of the near-infrared window into the body and the early development of near-infrared spectroscopy," *Journal of Biomedical Optics*, vol. 4, no. 4, p. 392, 1999.
- [34] J. Guo, K. Rahme, Y. He, L.-L. Li, J. Holmes, and C. O'Driscoll, "Gold nanoparticles enlighten the future of cancer theranostics," *International Journal of Nanomedicine*, vol. Volume 12, pp. 6131–6152, 2017.
- [35] Y. J. Lee, E.-Y. Ahn, and Y. Park, "Shape-dependent cytotoxicity and cellular uptake of gold nanoparticles synthesized using green tea extract," *Nanoscale Research Letters*, vol. 14, no. 1, 2019.

- [36] X. Xie, J. Liao, X. Shao, Q. Li, and Y. Lin, "The effect of shape on cellular uptake of gold nanoparticles in the forms of stars, Rods, and triangles," *Scientific Reports*, vol. 7, no. 1, 2017.
- [37] B. D. Chithrani, A. A. Ghazani, and W. C. Chan, "Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells," *Nano Letters*, vol. 6, no. 4, pp. 662–668, 2006.
- [38] S. Hameed, Y. Wang, L. Zhao, L. Xie, and Y. Ying, "Shape-dependent significant physical mutilation and antibacterial mechanisms of gold nanoparticles against foodborne bacterial pathogens (escherichia coli, pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus) at lower concentrations," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 108, p. 110338, 2020.
- [39] J. Penders, M. Stolzoff, D. J. Hickey, M. Andersson, and T. J. Webster, "Shape-dependent antibacterial effects of non-cytotoxic gold nanoparticles," *International Journal of Nanomedicine*, vol. Volume 12, pp. 2457–2468, 2017.
- [40] I. A. Wani and T. Ahmad, "Size and shape dependant antifungal activity of gold nanoparticles: A case study of candida," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 101, pp. 162–170, 2013.
- [41] I. Khan, K. Saeed, and I. Khan, "Nanoparticles: Properties, applications and toxicities," *Arabian Journal of Chemistry*, vol. 12, no. 7, pp. 908–931, 2019.
- [42] A. V. Rane, K. Kanny, V. K. Abitha, and S. Thomas, "Methods for synthesis of nanoparticles and fabrication of nanocomposites," *Synthesis of Inorganic Nanomaterials*, pp. 121–139, 2018.
- [43] V. Chikan and E. McLaurin, "Rapid nanoparticle synthesis by magnetic and microwave heating," *Nanomaterials*, vol. 6, no. 5, p. 85, 2016.
- [44] A. A. Efimov, A. A. Lizunova, I. A. Volkov, D. A. Mylnikov, P. V. Arsenov, and V. V. Ivanov, "A new approach to the high-yield synthesis of nanoparticles by spark discharge," *Journal of Physics: Conference Series*, vol. 741, p. 012035, 2016.
- [45] N. Pantidos, "Biological synthesis of metallic nanoparticles by bacteria, fungi and plants," *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*, vol. 05, no. 05, 2014.

- [46] E. Abbasi, M. Milani, S. Fekri Aval, M. Kouhi, A. Akbarzadeh, H. Tayefi Nasrabadi, P. Nikasa, S. W. Joo, Y. Hanifehpour, K. Nejati-Koshki, and M. Samiei, "Silver nanoparticles: Synthesis methods, bio-applications and properties," *Critical Reviews in Microbiology*, pp. 1–8, 2014.
- [47] Y. Kageyama, Y. Takaki, S. Shimamura, S. Nishi, Y. Nogi, K. Uchimura, T. Kobayashi, J. Hitomi, K. Ozaki, S. Kawai, S. Ito, and K. Horikoshi, "Intragenomic diversity of the V1 regions of 16S rna genes in high-alkaline protease-producing bacillus clausii spp," *Extremophiles*, vol. 11, no. 4, pp. 597–603, 2007.
- [48] J. Turkevich, P. C. Stevenson, and J. Hillier, "A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold," *Discussions of the Faraday Society*, vol. 11, p. 55, 1951.
- [49] E. A. Hauser and J. E. Lynn, "Separation and fractionation of Colloidal Systems," *Industrial & Engineering Chemistry*, vol. 32, no. 5, pp. 659–662, 1940.
- [50] M. M. Singer and R. S. Tjeerdema, "Fate and effects of the surfactant sodium dodecyl sulfate," *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, pp. 95–149, 1993.
- [51] H. Ohshima, *Electrical phenomena at interfaces and biointerfaces fundamentals and applications in nano-, bio-, and Environmental Sciences*. Hoboken: Wiley, 2012.