

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
«Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной  
Азии»  
Дальневосточного отделения Российской академии наук

На правах рукописи

**Югай Юлия Анатольевна**

**Использование клеточных культур растений для получения  
биологически активных наночастиц металлов**

Специальность 1.5.6 – Биотехнология (биологические науки)

Диссертация  
на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
к.б.н., доцент, Шкрыль Юрий Николаевич

ВЛАДИВОСТОК – 2021

## ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....	4
ВВЕДЕНИЕ .....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	10
1.1. Нанотехнология и наночастицы .....	10
1.2. Классификация наночастиц .....	12
1.3. Методы получения наночастиц .....	17
1.3.1. Физические методы синтеза НЧ металлов .....	19
1.3.2. Химические методы синтеза НЧ металлов .....	20
1.3.3. Биологические способы получения НЧ металлов .....	21
1.4. Современные методы анализа наночастиц.....	31
1.5. Применение наночастиц в медицине .....	33
1.6. Применение наночастиц в растительной биотехнологии .....	41
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	45
2.1. Материалы .....	45
2.2. Реактивы.....	49
2.3. Оборудование .....	50
2.4. Методы .....	50
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ .....	57
3.1. Скрининг восстановительной активности клеточных культур растений.....	57
3.2. Влияние условий реакции на получение наночастиц серебра и золота .....	58
3.3. Получение биметаллических наночастиц.....	65
3.4. Восстановительная активность отдельных компонентов каллусной культуры <i>L. erythrorhizon</i> .....	68
3.5. Получение наночастиц серебра с использованием полисахаридов морских водорослей ..	75
3.6. Получение наночастиц серебра с использованием клеточных культур <i>P. ginseng</i> .....	81
3.7. Получение трансгенных растений и клеточных культур <i>N. tabacum</i> , экспрессирующих ген силикатеина .....	87
3.8. Восстановительные свойства <i>LoSilA1</i> -трансгенных клеточных культур и растений табака.....	89
3.9. Биологические активности наночастиц .....	93
3.9.1. Элиситорная активность наночастиц серебра.....	93
3.9.2. Цитотоксическая активность Ag-НЧ и Au-НЧ, полученных с использованием каллусной культуры воробейника.....	96

3.9.3. Влияние Ag-НЧ и Au-НЧ, полученных с использованием каллусной культуры воробейника, на миграцию фибробластов .....	99
3.9.4. Цитотоксическая активность Ag-НЧ, полученных с использованием индивидуальных полисахаридов бурых водорослей.....	102
3.9.5. Антибактериальная активность Ag-НЧ, полученных с использованием индивидуальных полисахаридов бурых водорослей.....	104
3.9.6. Антибактериальная активность Ag-НЧ, полученных с использованием <i>LoSilA1</i> -экспрессирующей каллусной культуры табака .....	105
3.9.7. Фунгицидная активность Ag-НЧ, полученных с использованием культуры бородатых корней женьшеня.....	106
3.9.8. Стерилизация поверхности зерен пшеницы и их проращивание .....	110
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	112
ВЫВОДЫ .....	116
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	117

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- 4-ХФУ – 4-хлорфеноксиуксусная кислота  
 6-БАП – 6-бензил-аминопурин  
 АНУ – альфа-нафтилуксусная кислота  
 АФК – активные формы кислорода  
 ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография  
 ГЦК – гранецентрированная кубическая (структура кристаллической решетки)  
 ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота  
 ИРР – ингибирование радиального роста  
 ИУК – индол-3-уксусная кислота  
 КОЕ – колониеобразующая единица  
 миРНК – малые интерферирующие РНК  
 НЧ – наночастицы  
 ПААГ – полиакриламидный гель  
 ППР – поверхностный плазмонный резонанс  
 ПЦР – полимеразная цепная реакция  
 ПЭГ – полиэтиленгликоль  
 Среда ЛБ – среда Лурия-Бертани  
 Среда МС – среда Т. Мурасиге и Ф. Скуга  
 ЯМР – ядерно-магнитный резонанс  
 EDS – энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия (с англ. Energy-Dispersive X-ray Spectroscopy)  
 FeA – альгинат из водорослей *Fucus. evanescens*  
 FeF – фукоидан из водорослей *Fucus. evanescens*  
 FTIR – инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье (с англ. Fourier-Transform Infrared spectroscopy)  
 NTA – анализ траектории броуновского движения НЧ в растворе (с англ. Nanoparticle Tracking Analysis)  
 ScF – фукоидан из водорослей *Sacharina cichorides*  
 ScL – ламинаран из водорослей *Sacharina cichorides*  
 SEM – сканирующая электронная микроскопия (с англ. Scanning Electron Microscope)  
 TEM – трансмиссионная электронная микроскопия (с англ. transmission electron microscopy)  
 XRD – рентгеноструктурный анализ (с англ. X-Ray Diffraction)

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность темы исследования.** Наночастицы (НЧ) металлов благодаря своим уникальным оптическим, каталитическим, электрическим и биологическим свойствам обладают огромным потенциалом для применения в различных отраслях промышленности (Ferdous and Nemmar, 2020; Pardhi et al, 2020).

При этом существующие физические и химические способы получения НЧ не всегда отвечают требованиям эффективности, рентабельности и безопасности, предъявляемым к данным технологиям. Разработка альтернативных биологических и биохимических методов синтеза НЧ является актуальной задачей бионанотехнологии.

Получение новых наноматериалов с использованием биологических систем или процессов, представляет большой фундаментальный и практический интерес. Синтез НЧ металлов является стремительно развивающимся направлением в этой области (Ferdous and Nemmar, 2020). Наряду с физическими и химическими методами получения НЧ металлов, в последние годы большое внимание исследователей привлекают биотехнологические подходы. В качестве биологических объектов, используемых для синтеза НЧ металлов, наиболее широко используются микроорганизмы и растения, а также модифицированные и немодифицированные экстракты этих организмов.

Бактерии и грибы являются удобной системой для получения НЧ, поскольку методы культивирования многих видов отработаны в промышленном масштабе и не требуют больших затрат (Ferdous and Nemmar, 2020). При этом формирование НЧ может происходить как внутриклеточно, так внеклеточно. Однако использование микробиологического синтеза ограничено недостаточно высокой продуктивностью процесса, что, вероятно, связано с токсичным действием НЧ на клетки микроорганизмов, а также с потенциальной опасностью некоторых штаммов для человека, что, в свою очередь, ограничивает сферу применения НЧ.

Растения, также, как и микроорганизмы, способны образовывать НЧ как внутри, так и вне клеток (Gopinath and Velusamy, 2013). Высокое содержание различных биоактивных компонентов, включая белки, нуклеиновые кислоты, полисахариды и вторичные метаболиты, которые могут участвовать в формировании и стабилизации НЧ металлов, делает растения перспективным инструментом для их биотехнологического получения.

### **Степень разработанности темы.**

К настоящему времени, более 100 видов растений были изучены на предмет их способности формировать НЧ металлов (Sengul and Asmatulu, 2020). Частицы имели чаще треугольную, гексагональную и декаэдрическую формы, иногда образовывали стержни или были полидисперсными (Raj and Khan, 2016). Размеры варьировали, от единиц до сотен нанометров. Какой-либо закономерности в этом процессе пока выявить не удалось из-за непостоянства химического состава растений, связанного с почвенными, климатическими и

сезонными условиями культивирования. Понимание механизмов формирования частиц позволит влиять на их морфологические характеристики, включая размер и форму. В то же время применение клеточных культур растений для формирования НЧ металлов остается малоисследованной областью. Кроме того, изучение процесса формирования НЧ металлов в культивируемых клетках растений имеет ряд преимуществ, поскольку культура клеток является более простой системой по сравнению с целым растением, а параметры культивирования легко поддаются регулированию. В то же время, стандартные биотехнологические подходы, а также методы генетической инженерии позволяют проводить модификацию биосинтетических путей первичного и вторичного метаболизма быстрее, чем при работе с целым растением. В связи с вышесказанным, исследование восстановительного потенциала клеточных культур растений, их экстрактов и отдельных фракций представляет значительный теоретический и практический интерес.

**Целью настоящей работы** являлось исследование восстановительного потенциала растительных клеточных культур для получения наночастиц серебра и золота, а также изучение их свойств и возможности применения в медицине и биотехнологии.

Для реализации поставленной цели предполагалось решить следующие **задачи**:

1. Изучить восстановительную способность экстрактов клеточных культур растений, определить влияние условий реакции и вклад отдельных компонентов экстракта на процесс формирования металлических наночастиц.
2. Изучить восстановительную активность очищенных полисахаридов различной структуры на биосинтез и свойства наночастиц серебра.
3. Определить влияние генной модификации на восстановительные свойства трансгенных клеточных культур и растений.
4. Провести сравнительный анализ биологической активности наночастиц, полученных с использованием клеточных культур растений.

**Научная новизна работы.** В данной работе впервые изучен восстановительный потенциал клеточных культур модельных растений, табака обыкновенного *Nicotiana tabacum* резуховидки Таля *Arabidopsis thaliana*, а также лекарственных растений, марены сердцелистной *Rubia cordifolia*, женьшеня настоящего *Panax ginseng*, винограда культурного *Vitis vinifera* и воробейника краснокорневого *Lithospermum erythrorhizon*. Определено влияние различных факторов на эффективность продукции НЧ. Установлен вклад отдельных фракций экстракта в биосинтез НЧ серебра (Ag-НЧ). Было показано, что полисахариды, низкомолекулярные полифенольные соединения, белки и, в меньшей степени, нуклеиновые кислоты, проявляют синергетический восстановительный потенциал во время биологического синтеза металлических НЧ. Впервые был продемонстрирован альтернативный экологически безопасный синтез монодисперсных Ag-НЧ с использованием трех типов полисахаридов (альгинат, фукоидан, ламинаран) морских водорослей *Saccharina*

*cicharioides* и *Fucus evanescens*. Наши данные подтвердили предположение, что полисахариды способны выступать в качестве восстановительных и стабилизирующих молекул. Также в данной работе впервые осуществлен синтез биметаллических НЧ серебро/золото (Ag/Au-НЧ) с помощью клеточной культуры воробейника.

Впервые для биоинженерии восстановительного потенциала клеток растений были использованы методы генетической инженерии растений. Экспериментально установлено, что гетерологичная экспрессия генов, влияющих на первичный и вторичный метаболизм клеток, приводит к повышению их восстановительного потенциала, что положительно влияет на общую продукцию металлических НЧ.

В ходе выполнения данной работы было изучено цитотоксическое действие биогенных НЧ в отношении глиомы С6 крысы, нейробластомы N2A и эмбриональных фибробластов 3Т3 мыши *in vitro*, а также их влияние на скорость миграции фибробластов.

Была обнаружена способность Ag-НЧ активировать биосинтез вторичных метаболитов в культивируемых клетках растений, тем самым выступая в качестве элиситоров продукции ценных биологически активных веществ. Выявлены фунгицидные свойства биогенных Ag-НЧ в отношении нескольких возбудителей фузариоза пшеницы, включая *Fusarium graminearum*, *F. avenaceum*, *F. poae* и *F. sporotrichioides*.

**Теоретическая и практическая значимость.** Полученные в ходе работы данные представляют значительный интерес с точки зрения расширения знаний об особенностях формирования биогенных НЧ металлов с участием экстрактов клеточных культур растений и их отдельных компонентов. Выявление активных биомолекул экстракта позволит в дальнейшем более направленно проводить скрининг их продуцентов как наиболее перспективных биологических систем для продукции НЧ. Применение методов генной инженерии для активации вторичного метаболизма или гетерологичной экспрессии каталитически-активных макромолекул заложило основу для развития нового направления в области биоинженерии восстановительного потенциала клеток растений в отношении биологического способа получения НЧ. С точки зрения практического использования, полученные результаты имеют высокий потенциал для использования в области технологии получения биогенных НЧ металлов и их применения в биомедицине, сельском хозяйстве и биотехнологии. Стоит отметить, что наличие высоко- и низкомолекулярных биологических соединений, адсорбированных на поверхности образованных биогенных НЧ, в области т.н. «короны» обеспечивает им уникальную биологическую активность. Для полученных в рамках проекта частиц была продемонстрирована цитотоксическая, антибактериальная, элиситорная и фунгицидная активности. Высокая фунгицидная активность была подтверждена при обеззараживании семян пшеницы Российской селекции. Преимуществом биологического подхода является возможность использования для синтеза НЧ побочных продуктов биотехнологического производства, например, клеточного дебриса после

экстракции целевого продукта, отдельных примесных фракций, образующихся при технологическом процессе или компонентов отработанных питательных сред.

**Методология и методы исследования.** Теоретической основой исследования послужили современные научные труды отечественных и зарубежных авторов, посвященные поиску биологических, экологически безопасных, быстрых и дешевых методов эффективного синтеза НЧ металлов. Методологическую основу работы формируют биотехнологические объекты и подходы, методы молекулярной биологии и геномной инженерии, высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС), а также такие аналитические методы как ИК-спектроскопия с преобразованием Фурье (FTIR, Fourier-transform infrared spectroscopy), рентгеноструктурный (XRD, X-ray diffraction) и элементный (EDS, energy-dispersive X-ray spectroscopy) анализ, методы трансмиссионной (TEM, transmission electron microscopy) и сканирующей (SEM, scanning electron microscopy) электронной микроскопии, метод визуализации и анализа частиц в жидкостях (NTA, nanoparticles tracking analysis). Для получения трансгенных культур и растений на стадии подготовки и анализа использовались программы GeneRunner, ClustalW2, VectorNTI. Для отслеживания активности пролиферации использовалась высокопроизводительная визуализация на платформе Cell-iQ®. Для статистической оценки использовался t-критерий Стьюдента, обработку выполняли с использованием Statistica версии 10.0.

**Личный вклад автора.** Большая часть экспериментальной работы, представленной в диссертации, выполнена лично автором. Автор самостоятельно проводила культивирование клеточных линий растений, грибов и бактерий, осуществляла получение экстрактов и отдельных фракций, их характеристику, синтез и очистку всех описанных в работе образцов металлических НЧ. Автор осуществляла необходимую подготовку образцов для инструментальных методов анализа частиц, а также самостоятельно проводила определение их некоторых физико-химических параметров, используя спектрофотометрические, оптические и другие методы исследования. Анализ НЧ методами XRD, FTIR, TEM и SEM были выполнены совместно с сотрудниками Дальневосточного геологического института ДВО РАН и Института химии ДВО РАН. Непосредственно автором выполнено определение антибактериальной, элиситорной и фунгицидной активности НЧ. Определение цитотоксичности частиц проводили совместно с специалистами Дальневосточного федерального университета. Автор также принимала непосредственное участие в планировании экспериментальных работ, анализе, обсуждении и интерпретации полученных данных, подготовке иллюстраций и написании научных публикаций, материалов конференций, выступлений с докладами на конференциях. Написание рукописи диссертации выполнено соискателем лично.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Экстракт каллусной культуры *L. erythrorhizon* с высокой эффективностью индуцирует формирование монометаллических Ag-НЧ, Au-НЧ и биметаллических Ag/Au-НЧ; наиболее важным фактором для данного процесса является освещение реакционной смеси.
2. Восстановительный потенциал различных химических фракций экстракта воробейника увеличивается в ряду: нуклеиновые кислоты, белки, полисахариды и вторичные метаболиты, представленные производными кофейной кислоты.
3. Высокоочищенные индивидуальные полисахариды морских водорослей *S. cicharioides* и *F. evanescens* проявляют способность к синтезу монодисперсных Ag-НЧ.
4. Активация биосинтеза гинзенозидов в *rolC*-трансгенных корневых культурах женьшеня приводит к пропорциональному увеличению продукции Ag-НЧ.
5. НЧ, полученные с помощью клеточных культур растений, проявляют выраженную цитотоксическую, антибактериальную, фунгицидную и элиситорную активность.

**Степень достоверности результатов.** Достоверность результатов обеспечивается использованием комплекса современных методов анализа, взаимодополняющих друг друга, получены на современном оборудовании с применением стандартизированных и апробированных методик и программ, а также статистических методов анализа полученных данных, обеспечивающих их достоверность. Фактические материалы, представленные в работе, полностью соответствуют протоколам исследований и записям в лабораторных журналах. Результаты, научные положения и выводы подкрепляются экспериментальными данными, приведенными в виде фотографий, рисунков и таблиц.

**Апробация работы.** По теме диссертации опубликовано 8 работ, в том числе 4 статьи в рецензируемых научных журналах, индексируемых в Scopus и Web of Science и 4 тезисов конференций. Материалы диссертации были представлены на XV Всероссийской молодежной школе-конференции по актуальным проблемам химии и биологии (Владивосток, 2014), VI Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины» (Ростов-на-Дону, 2015), региональной научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых по естественным наукам (Владивосток, 2017) и международной конференции “Future of biomedicine” (Владивосток, 2019).

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Нанотехнология и наночастицы

Нанотехнологию можно определить, как междисциплинарную область науки и технологии, стоящую за разработкой методов синтеза, характеристики, анализа и применения функциональных материалов посредством манипулирования атомами и молекулами, параметры измерения, которых находятся до 100 нм (Sershen et al., 2000). Возможность использования структур, функций и процессов биологических молекул, комплексов и наносистем для производства новых функциональных наноструктурированных материалов способствовала появлению быстрорастущих направлений науки – нанобиотехнологии и бионанотехнологии, которые представляют собой области исследований на стыке нанотехнологий и биотехнологий (Chan et al., 2006). За последние несколько десятилетий значение нанотехнологии значительно возросло как с точки зрения новых приложений в области биомедицины, охраны окружающей среды, электроники, космической науки, в области исследований магнитных явлений, датчиков хранения и преобразования энергии и т. п., так и в связи с возросшим количеством промышленных научно-исследовательских компаний, применяющих нанотехнологии в своей деятельности (Raj and Khan, 2016). Хотя термины “нанобиотехнология” и “бионанотехнология” часто используются как синонимы, фактически они обозначают принципиально разные подходы и предмет исследования. Под нанобиотехнологией чаще всего понимают использование методов нанотехнологии для нужд биотехнологии, создание материалов или устройств для изучения биологических объектов и разработки новых диагностикумов, средств терапии и способов хранения информации (Petros and Desimone, 2010). Так, например, были разработаны нанофлюидные биочипы («лаборатория на чипе») – устройства для непрерывного разделения потоков и обнаружения таких макромолекул, как ДНК и белки (Kovarik and Jacobson, 2009; Gencoglu and Minerick, 2014), биосенсоры для оценки состояния окружающей среды, обнаружения биомаркеров и клинической диагностики (Yager et al., 2006; Gencoglu and Minerick, 2014), а также твердотельные нанопоровые датчики для секвенирования ДНК (Howorka and Siwy, 2009). С другой стороны, бионанотехнология относится к способам использования биотехнологических подходов для улучшения существующих или создания новых нанотехнологий путем изучения и применения принципов работы живых организмов и использования биологических молекул и систем в нанотехнологиях (Lee et al., 2012). В качестве примера можно привести применение свойств комплементарного спаривания оснований и молекулярной самосборки нуклеиновых кислот для создания полезных материалов, таких как ДНК-оригами, ДНК-наномшины, каркасов ДНК для электроники, фотоники и белковых массивов, а также аптамеров ДНК и РНК, рибозимов и

рибопереключателей (Guo, 2010; Pinheiro et al., 2011). Биомиметические технологии на основе использования белков, катализирующих реакции поликонденсации кремния *in vivo* применяют для синтеза новых полупроводниковых материалов, используемых в оптике и микроэлектронике (Jackson et al., 2015). В частности, силаффины диатомовых водорослей способны вызывать процесс управляемой преципитации диоксида кремния с образованием сферических структур, применяемых в биомедицине для биосовместимых материалов (Pamirsky and Golokhvast, 2013). Белок силикатеин из морских и пресноводных губок также способствует образованию НЧ диоксида титана, диоксида циркония, золота и серебра в растворах при нейтральном рН и комнатной температуре (Tahir et al., 2005; Tahir et al., 2006; Schröder et al., 2008; Sumerel et al., 2003; Bansal et al., 2005). В условиях *in vitro* силикатеин и силикатеин-подобные белки индуцировали формирование кристаллов кремнезема гексагональной сингонии (Kamenev et al., 2015; Shkryl et al., 2016). Рекомбинантный силикатеин также потенциально может быть использован для синтеза компонентов для электронных устройств, датчиков, преобразователей энергии, косметики и фармацевтики (Schröder et al., 2009). Хотя нанотехнологии в широком смысле основываются на производстве материалов различных типов структур/организации на наноразмерном уровне, значительное место в них занимают исследования НЧ. НЧ – это широкий класс материалов, состоящих из отдельных частиц с размером до 100 нм (Laurent et al., 2008). В зависимости от агрегатного состояния эти материалы могут быть представлены 0D (нульмерные), 1D (одномерные), 2D (двумерные) или 3D (трехмерные) структурами (Tiwari and Kim, 2012). Значение данных материалов определяется возможностью управления физико-химическими и биологическими свойствами вещества посредством изменения размеров, форм и кристаллической формы базовой наноструктуры (Dreaden et al., 2012).

Изменение свойств веществ в наноразмерном состоянии связано с большей относительной площадью поверхности к объему, повышенной реакционной способностью, стабильностью и механической прочностью, что позволяет применять их в различных областях (Smita et al., 2012). Более того, НЧ из одного материала могут быть представлены широким разнообразием размеров и форм, что определяет их свойства на макроуровне и значительно расширяет возможный спектр применения (Cho et al., 2013). У 0D образований такие параметры как длина, ширина и высота зафиксированы в одной точке, например, квантовые точки, фуллерены и НЧ металлов; у 1D структур выделяют только один параметр, например длину у углеродных нанотрубок и нановолокон; 2D объекты, к примеру, графен, имеют уже два параметра – длина, ширина; для 3D структур характерны параметры длины, ширины и высоты и представлены они широким разнообразием поликристаллов, которые, в свою очередь, могут быть сформированы за счет отдельных НЧ (Kha, Saeed and Khan, 2017).

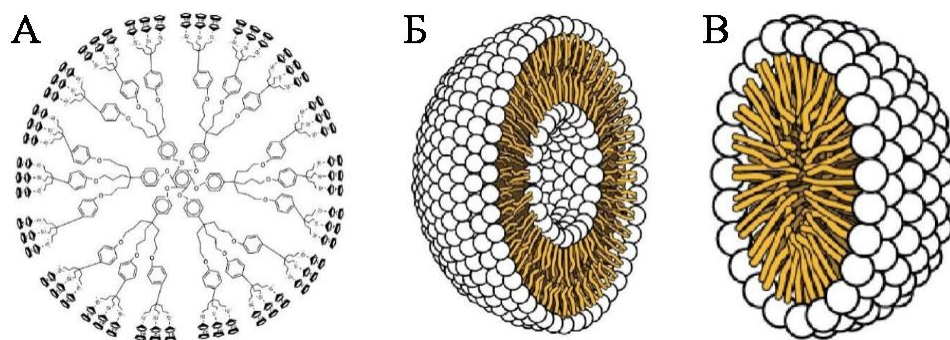
К настоящему моменту описаны сферические, цилиндрические, трубчатые, конические, полые, спиральные, плоские частицы, а также наноструктуры неправильной формы. НЧ могут быть как кристаллическими (с моно- или поликристаллической фазой), так и аморфными, и находиться как в свободной форме, например, коллоидного раствора, так и в агломерированном состоянии (Machado et al., 2015).

В настоящее время существуют многочисленные методы получения наноматериалов, однако актуальной задачей является разработка новых или усовершенствование существующих подходов для улучшения оптических, механических, физико-химических свойств частиц, а также снижения себестоимости их производства (Cho et al., 2013).

## 1.2. Классификация наночастиц

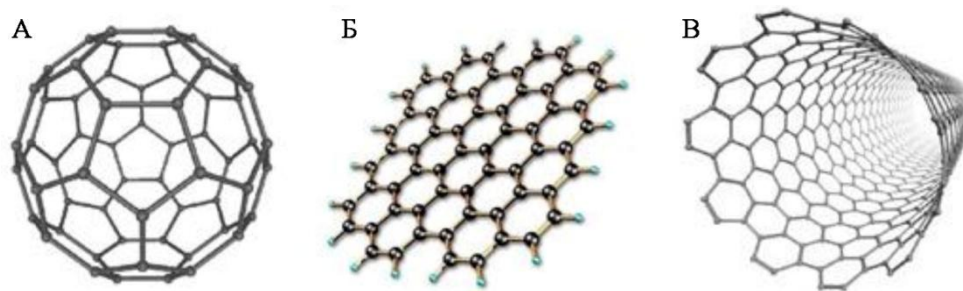
По своему составу НЧ обычно подразделяются на органические и неорганические. Последние, в свою очередь, могут быть получены на основе углерода и металлов. Кроме того, известны примеры синтеза гибридных наноструктур, состоящих как из органической, так и неорганической компонент.

**Органические НЧ** – конгломераты молекул, различной формы многокомпонентного состава, а также на основе индивидуальных органических макромолекул или полимеров. Такие НЧ являются, как правило, биоразлагаемыми и малотоксичными, что делает их привлекательными для биологических и биомедицинских приложений (Tiwari, Behari and Sen, 2008). Из разнообразия форм органических частиц наибольший практический интерес представляют дендримеры, липосомы и мицеллы (Рисунок 1). Дендримеры (Рисунок 1А) являются глобулярными макромолекулярными образованиями с симметрично разветвленной структурой, для которых разработаны методы поэтапного синтеза, позволяющие контролировать размер, степень разветвленности, молекулярную массу, реакционную способность и другие параметры (Carvalho, Reis and Oliveira, 2020). Липосомы (Рисунок 1Б) состоят из бислоя амфипатических молекул, замкнутых в двух concentрических кругах, в то время как мицеллы (Рисунок 1В) представляют собой замкнутые липидные монослои, в которых жирные кислоты присутствуют либо в полости, либо на поверхности (Wakaskar, 2018). Эти уникальные характеристики делают описанные объекты идеальными кандидатами для эффективной таргетной доставки лекарственных соединений, модификации биологических сред или поверхностей. Именно способность к транспортировке биопрепаратов, а также стабильность, биосовместимость и возможность модификации поверхности в значительной степени определяют область их применения и эффективность (Demetzos, 2016).



**Рисунок 1** – Органические НЧ (Апу, 2017). (А) Дендримеры, (Б) липосомы, (В) мицеллы.

**Неорганические НЧ, состоящие полностью из углерода** подразделяют на 3 основные группы: графен, фуллерены ( $C_{60}$ ) и углеродные нанотрубки (Рисунок 2) (Апу and Saravanakumar, 2017). С точки зрения состава эти материалы имеют много общего, однако, отличаются морфологией и уникальными физико-химическими свойствами. Графен (Рисунок 2Б) является самым тонким двумерным материалом, состоящим из слоя атомов углерода и соединенных  $sp^2$ -связями, образующими гексагональную структуру, напоминающую пчелиные соты, толщиной в 1 атом. Графен можно рассматривать как базовую субъединицу графита, фуллеренов, углеродных нанотрубок и нановолокон (Pérez-Caballero, Rekolainen and Koel, 2008). Фуллерены (Рисунок 2А) – это структуры, сферической формы, в которых атомы углерода скреплены  $sp^2$  гибридизацией. Приблизительно от 28 до 1500 атомов углерода образуют сферическую структуру с диаметрами до 8,2 нм для однослойных и от 4 до 36 нм – для многослойных фуллеренов (Yan et al., 2016). Углеродные нанотрубки (Рисунок 2В) представляют собой графеновую наноплёнку, которая скручивается в полые цилиндры с образованием трубчатых структур диаметром до 0,7 нм для однослойной и до 100 нм для многослойной наноструктуры с длиной от нескольких микрометров до нескольких миллиметров. Они состоят из чистого углерода, поэтому обладают высокой стабильностью, низкой токсичностью и высокой экологичностью. Материалы на основе углеродных частиц также обладают отличной биосовместимостью. Высокая электропроводность, большая площадь поверхности и линейная геометрия делают их поверхность легко доступной для электролитов (Moreno et al., 2016). Наноструктуры на основе углерода также обладают сильной анизотропной теплопроводностью. Это свойство позволяет использовать углеродные наноматериалы в современной вычислительной электронике, где температура неохлаждаемых чипов может достигать более 100 °С (Hong and Tai, 2008).



**Рисунок 2** – Неорганические НЧ на основе углерода: (А) фуллерены, (Б) графен, (В) углеродные нанотрубки (Anu and Saravanakumar, 2017).

**Металлические НЧ** – это нанообъекты, состоящие из атомов одного или нескольких металлов, имеющих, как правило, четкую кристаллическую решетку. Среди таких частиц нанокристаллы на основе благородных металлов привлекают к себе значительное внимание специалистов, как в научных, так и в прикладных областях исследований. Подобный интерес связан с их свойствами, такими как проводимость, каталитическая активность, химическая стабильность, а также широким спектром перспективных приложений этих свойств в электронике, фотонике и биосенсорике, биомедицине и сельском хозяйстве (Tabassum et al., 2012). Золото, серебро, иридий, рутений, родий и платина активно исследуются как в качестве самостоятельных терапевтических агентов, так и в роли безопасных переносчиков лекарственных субстанций. Первыми такими препаратами стали разработанные в 1929 году комплексы на основе коллоидного золота, которые применяли для лечения туберкулеза и ревматоидного артрита (Tabassum et al., 2012). В качестве более современного примера, можно упомянуть препараты на основе платины – цисплатин, а также его аналоги, которые часто применяют для лечения многих типов рака, особенно рака яичников, мочевого пузыря и мелкоклеточного рака легких (Szucova et al, 2006). В последние 10 лет количество исследований в данной области стремительно и неуклонно растет, особенно в с точки зрения возможности их применения в биомедицине. Например, НЧ серебра (Ag-НЧ) эффективно ингибировали рост клеточной линии MCF-2 и аденокарциномы молочной железы человека (Elangovan et al., 2015), притом жизнеспособность опухолевых клеток снижалась с увеличением концентрации. Исследования *in vitro* показали, что НЧ таких металлов и оксидов металлов, как Au, Ag, ZnO, Cu, TiO<sub>2</sub>, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> проявляют антибактериальную активность в отношении *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* (Wang et al., 2020; Alavi et al., 2019; Rajendra et al., 2010; Jiang, Mashayekhi and Xing, 2009). Помимо антибактериальной активности НЧ оксида церия (CeO<sub>2</sub>-НЧ) обладают противовоспалительным действием при перитоните, вызванном инфекцией *Staphylococcus epidermidis* (Li et al., 2020). Au-НЧ нашли применение для

определения аллергенов арахиса в пище (Alves et al., 2015) благодаря модифицированным Au-НЧ и Ag-НЧ появилась возможность обнаружения вероятных канцерогенных соединений в консервированных продуктах питания (Shi et al., 2018; Jigyasa, 2018). Вместе с тем, НЧ нашли применение в сельском хозяйстве – одним из широко используемых нанопестицидов является наноструктурированный оксид алюминия (Mittal et al., 2020), который действует как заряженный инсектицид, взаимодействуя с заряженными молекулами на поверхности хитина насекомых. Похожую активность проявляют также и медные НЧ (Cu-НЧ) (Zhao et al., 2020).

**Наночастицы золота** широко используются в области биотехнологии и биомедицины из-за их большой площади поверхности и высокой электронной проводимости. Высокая проницаемость и возможность накопления в клетках обуславливают их противоопухолевые свойства. Разработаны системы доставки лекарств на основе НЧ, которые используются для эффективного таргетирования на клетки злокачественных опухолей головного мозга, где обычная терапия не так эффективна (Hartono, Hody and Yung, 2010). Au-НЧ оказались наиболее безопасными и гораздо менее токсичными агентами для доставки лекарств по сравнению с НЧ других металлов (Lukianova-Nleb et al., 2012). В этой связи Au-НЧ используют в системах доставки лекарств, также широко, как и дендримеры и квантовые точки (Mishra, Gupta and Jain, 2010). Au-НЧ широко применяют в качестве контрастного вещества, например, в методах молекулярной визуализации, таких как компьютерная, позитронно-эмиссионная, магнитно-резонансная томография, оптическая и ультразвуковая визуализация (Etame et al., 2011). Au-НЧ подходят для иммобилизации на их поверхности различных функциональных групп, действуя как проводящие материалы и улучшая перенос электронов между поверхностью НЧ и целевым аналитом.

**Наночастицы серебра.** Из всех металлических частиц, Ag-НЧ характеризуются наибольшей степенью коммерциализации в различных сферах деятельности. На долю Ag-НЧ ежегодно приходится более 450 тонн, что составляет не менее половины от общемирового производства всех наноматериалов (Pulit-Prociak and Banach, 2016; Ferdous and Nemmar, 2020). Серебро является достаточно привлекательным материалом благодаря своим отличительным свойствам, таким как высокая проводимость, химическая стабильность, каталитическая и антимикробная активность (Frattini et al., 2005). Ag-НЧ являются одним из наиболее широко используемых наноматериалов в продуктах личной гигиены, мазях, перевязочных лентах для лечения внешних ран, а также для стерилизации хирургических инструментов (Dahl and Maddux, 2007; Hutchison, 2008; Anastas and Warner, 1998). Кроме того, Ag-НЧ используют в биологии и медицине, в качестве наноносителей лекарств или вакцин, в биосенсорах и имплантируемых материалах (DeSimone, 2002). Серебряные наноматериалы нулевого, первого и второго порядка, такие как нанопроволоки и нанокубы,

рассматриваются как наиболее перспективные для применения в оптике и катализе (Thompson D.G. et al., 2008; Pradhan, Pal and Pal, 2002; Ahn et al., 2009). Кроме того, Ag-НЧ используют как субстраты в спектроскопии комбинационного рассеяния света (рамановской спектроскопии), так как для осуществления данного метода требуется электропроводящая поверхность. Более того, Ag-НЧ все чаще используются на практике для борьбы с бактериальными инфекциями, в качестве альтернативы антибиотикам (Ramakritinan et al., 2013). В настоящее время общепризнано, что широкое применение антибиотиков привело к появлению штаммов бактерий с множественной лекарственной устойчивостью (Nikaido, 2009; Pardhi et al., 2020). Текущее развитие антибиотикорезистентности среди патогенных для человека бактерий даже называют “идеальным штормом”, который угрожает ввергнуть человечество в пост-антибиотическую эру, когда обычные инфекции снова станут смертельными (Gould, 2009). При этом, Ag-НЧ проявляли бактерицидное действие в отношении ампициллин-устойчивого штамма *Escherichia coli*, эритромицин-устойчивого штамма *Streptococcus pyogenes* и других (Humberto et al., 2010). Кроме того, известно и о фунгицидных свойствах Ag-НЧ, например, в отношении *Fusarium graminearum* (Ibrahim et al., 2020), *Fusarium oxysporum* (Gopinath and Velusamy, 2013), *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus flavus* и *Penicillium digitatum* (Al-Zubaidi, Alayafi and Abdelkader, 2019), *Trichosporon asahii* (Xia, Ma and Wang, 2016). Вследствие биологической активности, Ag-НЧ также нашли применение в биотехнологии растений в качестве стерилизующих агентов. Ag-НЧ демонстрировали высокий процент ингибирования контаминации при стерилизации эксплантов *Prunus amygdalus* (Arab et al., 2014), *Vitis vinifera* (Gouran et al., 2014), а также семян *Arabidopsis thaliana* (Mahna, Vahed and Khani, 2013).

**Биметаллические наночастицы.** В последние годы внимание ученых привлекли полиметаллические НЧ, поскольку они обладают улучшенными электронными, оптическими, магнитными и каталитическими свойствами (Liu et al., 2005; Sun et al., 2004; Yano K. et al., 2009; Zhang et al., 2012), которые качественно и количественно отличаются от свойств монометаллических НЧ (Jacob J., Mukherjee and Kapoor, 2012). Shankar и соавторы (Shankar et al., 2004) были первыми, кто сообщил о синтезе биметаллических НЧ золота и серебра (Au/Ag-НЧ) с использованием экстрактов листьев нима (*Azadirachta indica*) в качестве восстанавливающего агента. Позже Shenу и соавторы (Sheny, Mathew and Philip, 2011) синтезировали Au/Ag-НЧ типа ядро-оболочка, используя смесь ионов серебра и золота с экстрактом листьев *A. occidentale*.

В отличие от монометаллических НЧ, помимо размера и формы, другим параметром, который сильно влияет на свойства полиметаллических НЧ, является, разумеется, их состав, а точнее соотношение входящих в структуру атомов и их взаимное расположение (Cui et al.,

2006). Комбинацией двух разных металлов, можно получить три различных типа НЧ: смесь монометаллических НЧ, НЧ биметаллических сплавов и структуры ядро-оболочка, причем все типы перечисленных НЧ имеют разные оптические, физико-химические и биологические свойства (Mazhar, Shrivastava and Singh, 2017). Особый интерес представляют нанокompозиты типа ядро-оболочка и сплавы. Первые представляют собой простые конструкции, в которых активная металлическая оболочка покрывает другой металл, выступающий в качестве ядра (Mazhar, Shrivastava and Singh, 2017). Нанокompозиты сплавов представляют собой НЧ легированных металлов со смешанными кристаллическими фазами. Основным фактором, который отличает НЧ сплавов от биметаллических частиц типа ядро-оболочка, является перекрытие энергетических зон, входящих в состав сплава элементов. Таким образом плазмонное поведение наноструктур сплава является результатом изменения диэлектрической проницаемости свойств смешанного материала. Напротив, НЧ типа ядро-оболочка демонстрируют отличные свойства поверхностного плазмонного резонанса (ППР), которое является гибридом отдельных плазмонных колебаний ядра и оболочки (Prodan et al., 2003).

Биметаллические Ag/Au-НЧ демонстрируют более выраженные каталитическую и антимикробную активности (AbdelHamid et al., 2013; Salunke et al., 2014), поверхностно-усиленное комбинационное рассеяние (Cui et al., 2006), они более чувствительны при использовании в качестве сенсорных зондов (Navas and Soni, 2014; Pena-Rodriguez and Pal, 2011), что делает их особенно подходящими в качестве наноагентов в терапии рака (Pena-Rodriguez and Pal, 2011).

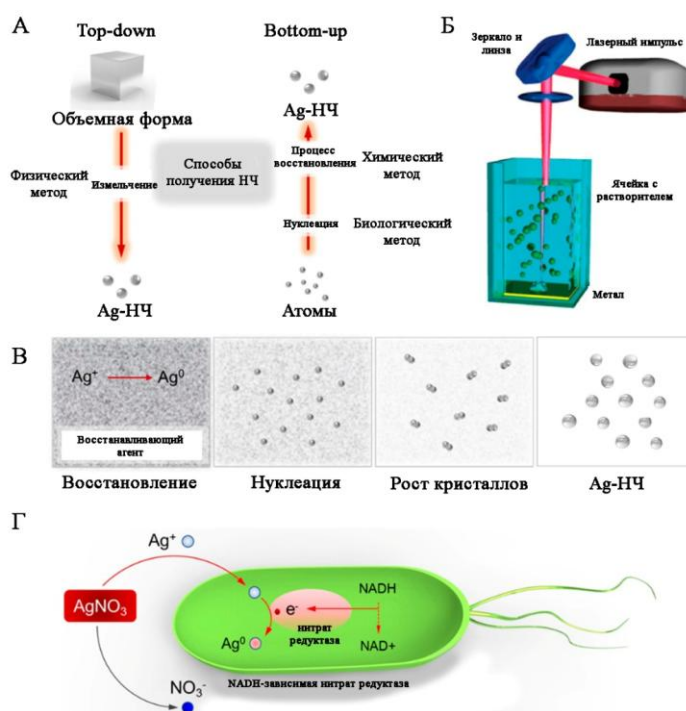
### **1.3. Методы получения наночастиц**

В настоящее время для получения НЧ разработан широкий спектр различных физических и химических подходов (Рисунок 3). При этом все существующие методы можно разделить на два основных принципа формирования НЧ, которые могут применяться к любым исследованиям в области наноразмерных объектов: подход top-down (сверху-вниз) и bottom-up (снизу-вверх). Каждый из них имеет определенные особенности и сферы применения (Ahmed et al., 2016).

В подходах top-down (Рисунок 3А) исходные материалы-предшественники распадаются на частицы наноразмерного диапазона посредством внешнего воздействия, например, механического дробления, травления, лазерной абляции, распыления, электровзрыва и испарения-конденсации (Hodaiei, Ataie and Mostafavi, 2015; Gharegozloo et al., 2016). Однако, эти методы довольно дорогостоящие и часто вызывают дефекты на поверхности частиц, что приводит к серьезным ограничениям в их использовании, поскольку

поверхность частиц влияет на физико-химические свойства материала (Mittal, Chisti and Banerjee, 2013).

В методах bottom-up (Рисунок 3Б) процесс синтеза начинается с самосборки атомов/молекул в ядра, а затем происходит образование частиц в наноразмерном диапазоне (Ahmed et al., 2016). Примерами такого подхода являются методы соосаждения, золь-гель перехода и атомной конденсации (Ataie and Mali, 2008; Mostafavi, Babaei and Ataie, 2015; Lesani et al., 2016). Синтез снизу-вверх, в основном предполагает химические и биологические методы производства НЧ. При этом химические методы зачастую используют агрессивные и токсические компоненты, что может негативно влиять на окружающую среду, а также несет потенциальный риск для человека (Ahmed et al., 2016; Mittal, Chisti and Banerjee, 2013).



**Рисунок 3** – Общая схема получения НЧ на примере Ag-НЧ (Lee and Jun, 2019). (А) Принцип подходов top-down (сверху-вниз) и bottom-up (снизу-вверх). (Б) Пример физического метода top-down синтеза с помощью лазерной абляции. (В) Схематическое представление химического bottom-up подхода от восстановления ионов серебра до формирования НЧ. (Г) Иллюстрация биологического bottom-up подхода восстановления ионов серебра. Биовосстановление ионов  $Ag^+$  инициируется окислительно-восстановительной реакцией с участием никотинамидадениндинуклеотид (НАДН)-зависимой редуктазы, в качестве переносчика электронов, с образованием  $NAD^+$  и атомарного серебра  $Ag^0$ , который формирует кристаллическую решетку растущей НЧ.

### 1.3.1. Физические методы синтеза НЧ металлов

Метод испарения-конденсации является основным в физических методах производства металлических НЧ и предполагает использование трубчатой печи, работающей при атмосферном давлении. Данным способом были получены стабильные тонкие пленки с равномерным распределением материала без добавления каких-либо поверхностно-активных веществ (Lee and Jun, 2019). Было установлено, что синтезированные НЧ хорошо сохраняют стабильность и не агрегировали даже при высоких температурах. Полученные НЧ имели преимущественно сферическую форму, и распределение размеров не менялось в течение длительного хранения. Этот метод использовали для изготовления НЧ с узким распределением по размерам в температурном диапазоне 290 °С. Полученные НЧ по завершению процесса находятся в порошковой форме со средним размером около 9,5 нм (Jung, J.H. et al., 2006). Однако эта процедура имеет некоторые недостатки, поскольку она требует большого пространства для установки печи и большего количества энергии для достижения термической стабильности (Lee and Jun, 2019).

Изготовление металлических НЧ без использования поверхностно-активных веществ было также достигнуто с помощью метода дугового разряда. С помощью этого метода были получены стабильные Ag-НЧ со средним размером 10 нм с использованием бомбардировки искровым разрядом (Tien et al., 2008). Технология была адаптирована для крупномасштабного производства, но пока является достаточно дорогостоящей и опасной для окружающей среды.

Метод прямого распыления металлов в жидкой среде, зачастую применяется для синтеза Au-НЧ и Ag-НЧ. Этот метод включает физическое осаждение ионов металлов в глицерине, в результате чего образуются НЧ с узкой дисперсией. Этот метод позволяет получать НЧ круглой формы со средним диаметром 4 нм. Такие НЧ обладали устойчивостью к агрегации даже в виде разбавленных водных суспензий (Laurent et al., 2008).

Лазерная абляция включает производство НЧ путем абляции объемных материалов и использования лазерного луча большой мощности в среде. Эффективность производства НЧ в данном случае зависит от длины волны лазерного излучения, воздействующего на металл, длительности лазерного импульса, времени, необходимого для абляции, типа используемой среды и наличия или отсутствия поверхностно-активных веществ. Например, Ag-НЧ с помощью лазерного импульса синтезируются за фемтосекунды. При этом размер НЧ увеличивается с увеличением мощности излучения при уменьшении концентрации поверхностно-активного вещества (Mafune et al., 2001). НЧ золота и серебра можно также синтезировать подобным образом с использованием ряда методов облучения, таких как  $\gamma$ -облучение (Cheng et al., 2007), микроволновое излучение (Saifuddin, Wong and Yasumira,

2009) и лазерное излучение (Abid et al., 2002). В этом случае происходит в три этапа: (i) зародышеобразование, (ii) накопление и (iii) рост. Эти методы позволяют получать стабильные НЧ с узким распределением размеров.

### 1.3.2. Химические методы синтеза НЧ металлов

Химические методы синтеза металлических НЧ в растворе основаны на использовании трех основных компонентов: предшественников металлов, восстанавливающих и стабилизирующих веществ. Наиболее часто в качестве восстановителя в этих методах применяют цитрат натрия, боргидрид натрия, этиленгликоль и глюкозу. Вышеперечисленные вещества отвечают за восстановление ионов металлов с последующим зародышеобразованием и, в конечном итоге, приводят к образованию металлических НЧ (Kojima et al., 2010). Стабилизирующие вещества добавляют непосредственно в процессе реакции восстановления, что способствует росту НЧ, а также предотвращает их агрегацию. Затравочный метод роста НЧ подразумевает добавление затравки в среду для инициации формирования НЧ контролируемого размера. Посредством изменения скорости гетерогенного осаждения и скорости роста кристаллов можно также регулировать размер формирующихся НЧ. Типичным примером такого подхода могут служить НЧ золота, инкапсулированные внутри полиэтиленгликоля, который дополнительно служит и в качестве затравки. Этот метод, основан на принципах т.н. “мокрой” химии и подразумевает, что восстановление ионов золота происходит за счет формальдегида и дендримеров полиэтиленгликоля, которые действуют как модификаторы поверхности. Такой подход позволяет получать НЧ различной морфологии, варьируя типом используемого покрывающего агента (Kojima et al., 2010). В качестве связующего звена используют бифункциональный лиганд – цетилтриметиламмония бромид, частично функционализированный между твердой подложкой и НЧ золота (Nikoobakht and El-Sayed, 2003). Описан метод однофазного синтеза мономорфных Au-НЧ размером 3,7 нм с использованием пептид-бифенильных гибридов в качестве восстанавливающих и стабилизирующих агентов (Sharma et al., 2016). Подобный подход был использован для ступенчатого восстановления ионов серебра с образованием Ag-НЧ за счет использования полиоксометаллатов в качестве восстановителя (Troupi, Niskia and Papaconstantinou, 2002). Кроме того, монодисперсные сферические НЧ металлов с заданным размером удалось получить с использованием полиольного синтеза и инъекции предшественников. Этот метод предполагает быстрое зародышеобразование, что приводит к получению НЧ одинакового размера. Также отмечалось, что скорость впрыска и температура реакции играли важную роль в определении размера образующихся НЧ. Полиольный процесс с использованием

модифицированной техники впрыска прекурсора был использован для синтеза Ag-НЧ сферической формы размером 17 нм при скорости впрыскивания 2,5 мл/с и температуре реакции 100 °С (Kim, Jeong and Moon, 2006).

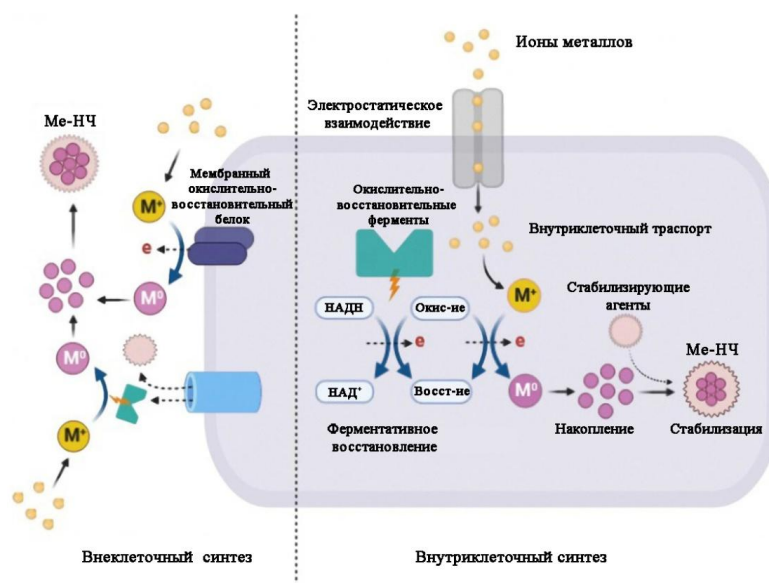
Стоит, однако, отметить, что большинство химических методов получения НЧ представляют потенциальную угрозу для окружающей среды из-за использования в технологическом процессе различных агрессивных химикатов таких как, гидразин или битартрат калия, имеющих выраженную канцерогенную, генотоксичную и цитотоксичную активности (Nath and Banerjee, 2013). В особенности вышесказанное касается использования химических методов синтеза НЧ для биомедицинского применения вследствие их потенциальной токсичности и несовместимости с большинством биообъектов (Shah M. et al., 2015; You et al., 2013). Таким образом, в настоящее время разработка новых экологически безопасных подходов, которые позволяли бы контролировать размер, форму и другие функциональные свойства НЧ является важным направлением исследований в области бионанотехнологии.

### **1.3.3. Биологические способы получения НЧ металлов**

Не смотря на разнообразие физических и химических методов синтеза НЧ, потребность в разработке новых подходов продолжает расти. В настоящее время большое внимание исследователей привлекают биотехнологические подходы получения НЧ металлов, в которых в качестве катализатора процесса применяют живые организмы, живые системы или их производные в виде грубых фракций и очищенных биомолекул. Помимо рентабельности и экологической безопасности, преимущества биологического подхода перед традиционными физическими и химическими методами включают в себя эффективность процесса катализа реакций в водных средах при обычных значениях температуры и давления, а также гибкость процесса, поскольку он может быть реализован практически в любых условиях и в любом масштабе (Schrofel et al., 2014). Восстановительный потенциал биологических систем обычно ассоциирован с несколькими соединениями, присутствующими в клетке, такими как макромолекулы (полисахариды, белки, нуклеиновые кислоты) и низкомолекулярные компоненты (флавоноиды, терпеноиды, алкалоиды и др.) (Asmathunisha and Kathiresan, 2013). В процессе реакции эти соединения вступают во взаимодействие с молекулами предшественника и между собой, что обуславливает формирование НЧ при использовании того или иного биообъекта.

### 1.3.3.1. Получение наночастиц с использованием бактерий

В качестве биообъектов, используемых для синтеза НЧ металлов, наиболее хорошо исследованы микроорганизмы. Бактерии чрезвычайно разнообразны по биохимическому составу, многих из них можно изолировать из окружающей среды и подобрать оптимальные условия культивирования, что делает их перспективными агентами для синтеза НЧ (Таблица 1). Также, при необходимости, биосинтетические параметры бактериальных клеток можно контролировать за счет условий культивирования, таких, например, как состав среды, температура, аэрация и др. Изменяя эти параметры можно добиться получения НЧ с заданными размером и формой.



**Рисунок 4** – Внеклеточный и внутриклеточный способ получения НЧ металлов с помощью бактерий (Bahrulolum et al., 2021). Me-НЧ – металлические НЧ; НАД<sup>+</sup> – никотинамид-аденин-динуклеотид; НАДН – восстановленный никотинамид-аденин-динуклеотид.

Биохимические механизмы, управляющие бактериальным синтезом НЧ были частично идентифицированы, и в настоящее время активно исследуются для более полного понимания процесса. К таким механизмам можно отнести различные способы модификации растворимости предшественника, биоадсорбцию, биоаккумуляцию, осаждение металлов и системы клеточного транспорта (Liu and Catchmark, 2019). Эти процессы в целом формируют у бактерий механизмы устойчивости к неорганическим компонентам за счет различных ферментных каскадов. Основной тип задействованных ферментов в этих процессах – редуктазы, например, оксидоредуктазы, нитратредуктазы и сульфитредуктазы (Kumar et al., 2007). Более частным примером микроорганизмов-восстановителей являются магнитотактические бактерии, формирующие магнитосомы – специфические клеточные

органеллы, содержащие нанокристаллы оксида и сульфида железа, облаченные в липидные мембранные оболочки (Yan et al., 2017). Благодаря своим уникальным свойствам магнетосомы могут применяться в таргетной терапии (Xiang et al., 2007), молекулярной визуализации (Roda et al., 2016), в биосенсорике (Tsekhmistrenko et al., 2020) и др. Другим интересным примером являются способные к азотфиксации виды цианобактерий. У этих организмов процесс восстановления атмосферного газообразного азота до аммиака катализирует фермент нитрогеназа, который может играть роль как в инициации восстановления ионов металлов, так и дальнейшем контроле роста нанокристалла (Brayner et al., 2007). При этом высокая скорость роста делают цианобактерии перспективной биологической системой для синтеза НЧ металлов в промышленных масштабах. Более того, для процесса восстановления могут быть использованы как экстракты цианобактерий, так и интактные культуры (Brayner et al., 2007; Hamida et al., 2020; Mahdieha et al., 2012).

В целом, использование бактерий для биологического синтеза НЧ представляется достаточно многообещающим подходом ввиду их большого разнообразия. Однако использование микробиологического синтеза ограничено недостаточно высокой продуктивностью, которая, возможно, связана с токсическим действием НЧ на клетки микроорганизмов, а также с потенциальной опасностью некоторых штаммов для человека, что в свою очередь ограничивает сферы применения НЧ. Существенными проблемами также являются очистка НЧ и трудности с контролем их формы из-за отсутствия полного понимания механизмов формирования нанокристаллов (Mukherjee et al., 2002). С помощью данного подхода исследователям пока сложно получать монодисперсные частицы с контролируемыми формами и размерами в условиях крупномасштабного производства.

**Таблица 1.** Получение НЧ металлов с использованием бактерий

Наименование организма	Металл	Размер (нм)/Форма	Ссылка
<i>Pseudomonas rhodesiae</i>	Ag	20-100, сферические	(Hossain et al., 2019)
<i>Bacillus siamensis</i>	Ag	25-50, сферические	(Khan, Saeed and Khan, 2019)
<i>Bacillus cereus</i>	Ag	18-39, сферические	(Ahmed et al., 2020)
<i>Pseudomonas poae</i>	Ag	20-45, сферические	(Ibrahim et al., 2020)
<i>Bacillus sp.</i>	Ag	7-21, сферические	(Gopinath and Velusamy, 2013)
<i>Serratia sp.</i>	Ag	10-20, сферические	(Mishra et al., 2014)
<i>Stenotrophomonas sp.</i>	Ag	12, сферические	(Mishra et al., 2017)
<i>Pseudomonas sp.</i> и <i>Achromobacter sp.</i>	Ag	20-50, сферические	(Kaur et al., 2018)
<i>Aeromonas hydrophila</i>	ZnO	57-72, кристаллические	(Jayaseelan et al., 2012)
<i>Streptomyces spp.</i>	CuO	78-80, сферические	(Hassan et al., 2019)
<i>Streptomyces capillispiralis</i>	Cu	4-59, сферические	(Hassan et al., 2018)
<i>Streptomyces griseus</i>	Cu	5-50 сферические	(Hassan et al., 2018)
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Ag	10-20, полиморфные	(Jain and Kothari, 2014)
<i>Bacillus licheniformis</i>	Ag	77-92, полиморфные	(Elbeshehy, Elazzazy and Aggelis, 2015)

### 1.3.3.2. Получение наночастиц с использованием грибов

Синтез НЧ с использованием грибов имеет определенные преимущества по сравнению с бактериями. К таковым можно отнести простоту масштабирования, экономическую рентабельность, а также экологичность технологического процесса (Syed and Ahmad, 2012). В Таблице 2 приведены некоторые примеры исследований, посвященных синтезу НЧ с использованием грибов.

Грибы содержат ферменты, способные инициировать процесс формирования НЧ, как в цитоплазме, так и в клеточной стенке, что может обеспечить как внутри, так и внеклеточный синтез (Chatterjee et al., 2020). Ионы металлов адсорбируются на поверхности клеток за счет разности зарядов ионов-предшественников и компонентов стенок. Кроме того, грибы активно секретируют значительное количество белка в культуральную жидкость, тем самым увеличивая эффективность синтеза НЧ. Зачастую НЧ, получаемые внутриклеточно меньше тех, которые формируются внеклеточно. Кроме того, способность к внутриклеточной аккумуляции может быть использована в биоремедиации загрязнений. (Crane et al., 2011). С другой стороны, при внеклеточном синтезе НЧ конечный материал

лишен нежелательных клеточных примесей, а также позволяет многократно использовать клеточную культуру в технологическом процессе, т.к. для выделения частиц не требуется разрушение клеток-продуцентов (Crane et al., 2011).

В качестве идентифицированных биомолекул-восстановителей из грибов наиболее изученной является  $\alpha$ -НАДФН-зависимая нитратредуктаза, выделенная из *F. oxysporum*. Эти молекулы вызвали быстрое образование стабильных монодисперсных Ag-НЧ от 10 до 25 нм. (Kumar et al., 2007). У другого гриба, *Cladosporium cladosporioides*, выделенного из морских водорослей *Sargassum wightii* была идентифицирована изоформа НАДФН-зависимой редуктазы, которая в комплексе с фенольными соединениями индуцировала формирование квази-сферических Au-НЧ со средним размером 72 нм (Bhargava et al., 2016).

Помимо Au-НЧ и Ag-НЧ, грибы способны синтезировать НЧ оксидов и других металлов таких, как медь, оксиды цинка, железа и марганца, сульфида кадмия. В частности, культура *Aspergillus terreus* была способна к внеклеточному синтезу магнетита – широко распространенному оксиду железа, проявляющему магнитные свойства (Kumari et al., 2020). Наноматериалы с магнитными свойствами широко используют для удаления тяжелых металлов и радиоактивных материалов (Ding et al., 2015). НЧ магнетита более эффективны по сравнению с НЧ других металлов поскольку позволяют легко отделять их от сточных вод за счет электростатического и поверхностного комплексообразования. Кроме того, НЧ магнетита нашли широкое применение в таких приложениях, как магнитно-резонансная томография (Reigneux et al., 2016), а также иммобилизация на поверхности различных биомолекул (антитела, белки, ферменты и т.д.) (Mosley, 2016). Как и в случае с применением бактерий, использование грибов также имеет серьезный недостаток с точки зрения биобезопасности. Некоторые виды грибов, например, *F. oxysporum*, являются патогенами и поэтому их использование не является безопасным для человека. В то же время получение безопасных НЧ для различных приложений могут быть использованы различные представители непатогенных грибов рода *Trichoderma* (El-Moslamy et al., 2017; Elamawi, Al-Harbi and Hendi, 2018; Guilger et al., 2017; Tripathi, Shrivastav and Shrivastav, 2018).

**Таблица 2.** Получение НЧ металлов с использованием грибов

<b>Наименование организма</b>	<b>Металл</b>	<b>Размер (нм)/Форма</b>	<b>Ссылка</b>
<i>Trichiderma hazarium</i>	Ag	11-13, сферические	(El-Moslamy et al., 2017)
<i>Aspergillus niger</i>	Ag	10-100, сферические	(Al-Zubaidi, Alayafi and Abdelkader, 2019)
<i>Aspergillus niger</i>	ZnO	53-69, сферические	(Kalpana et al., 2018)
<i>Penicillium duclauxii</i>	Ag	3-32, сферические	(Almaary et al., 2020)
<i>Setosphaeria rostrata</i>	Ag	2-50, сферические	(Akther and Hemalatha, 2019)
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Ag	1-25, сферические	(Elamawi, Al-Harbi and Hendi, 2018)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Au	10-30, сферические	(El Domany et al., 2018)
<i>Trichoderma harzianum</i>	Ag	20-30, сферические	(Guilger et al., 2017)
<i>Trichoderma harzianum</i>	Au	32-44, сферические	(Tripathi, Shrivastav and Shrivastav, 2018)
<i>Guignardia mangiferae</i>	Ag	5-30, сферические	(Balakumaran, Ramachandran and Kalaichelvan, 2015)
<i>Arthroderma fulvum</i>	Ag	13-18, сферические	(Xue et al., 2016)
<i>Aspergillus versicolor</i>	Ag	5-39, сферические	(Elgorban et al., 2016)
<i>Fusarium solani</i>	Ag	5-30, сферические	(Abd El-Aziz et al., 2015)
<i>Cephalosporium sp.</i> и <i>Trichoderma sp.</i>	Ag	20-50, сферические	(Kaur et al., 2018)
<i>Candida albicans</i>	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	80, сферические	(Hassan, 2015)
<i>Candida glabrata</i>	CdS	2	(Dameron et al., 1989)
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Cu	10,5, сферические	(Salvadori et al., 2014)

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MnO <sub>2</sub>	15-70, гексагональные и сферические	(Salunke et al., 2015)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ZnO	52,72	(Pavani et al., 2015)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ag	10, сферические	(Roy, Sarkar and Ghosh, 2014)
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	CdS	2	(Dameron et al., 1989)
<i>Yarrowia lipolytica</i> NCIM 3589	Au	9-27, полиморфные	(Pimprikar et al., 2009)
<i>Yarrowia lipolytica</i> NCYC 789 and its melanin	Ag	15	(Apte et al., 2013)

### 1.3.3.3. Получение НЧ с использованием водорослей и цианобактерий

Водоросли являются частью царства протистов и включают в себя автотрофные и водные фотосинтезирующие организмы, как одноклеточные, так и многоклеточные. Способность водорослей синтезировать НЧ объясняется преимущественно включением в их клеточные стенки биоактивных соединений. Примерами таких соединений являются альгинат и ламинарин, которые содержат реактивные сульфатные, карбоксильные или фосфатные группы. Стабилизация НЧ осуществляется, как правило, за счет гидроксильных или аминогрупп полипептидов (Sharma et al., 2016). При использовании макрофитов для получения НЧ обычно готовят их водный экстракт или используют выделенные и очищенные фракции полисахаридов, биосинтетическая способность которых может различаться (Таблица 3) (Kumaresan et al., 2018). На процесс восстановления влияют различные факторы, такие как pH, температура, концентрация компонентов и время реакции восстановления. Помимо морских водорослей Au-НЧ и бионаноконпозиты Au/Si-НЧ могут быть синтезированы и в таких микроводорослях, как диатомеи (*Nannochloris atomus* и *Diadesmic gallica*) (Jacob et al., 2020). Другая известная микроводоросль – *Chlorella vulgaris* – индуцирует формирование Ag-НЧ и НЧ палладия с широким спектром биологических активностей (Soleimani and Habibi-Pirkoohi, 2017; Arsiya, Sayadi and Sobhani, 2017). Хотя водоросли способны инициировать биосинтез НЧ металлов, существует ряд ограничений, которые необходимо преодолеть, прежде чем этот метод можно будет считать перспективным. Процесс приготовления экстракта трудоемок, а общий выход НЧ значительно ниже по сравнению с большинством описанных физико-химических методов (Fatima et al., 2020).

**Таблица 3.** Получение НЧ металлов с использованием водорослей

Наименование организма	Металл	Размер (нм)/Форма	Ссылка
<i>Sargassum wightii</i>	ZrO <sub>2</sub>	18, сферические	(Kumaresan et al., 2018)
<i>Neochloris oleoabundans</i>	Ag	40, сферические	(Arsiya, Sayadi and Sobh, 2018)
<i>Cystoseira baccata</i>	Au	8,4, сферические	(González-Ballesteros et al., 2017)
<i>Stephanopyxis turris</i>	Au	10-30, сферические	(Pytlík et al., 2017)
<i>Galaxaura elongate</i>	Au	3,85-77, полиморфные	(Abdel-Raouf, Al-Enazi and Ibraheem, 2017)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Pd	5-20, сферические	(Arsiya, Sayadi and Sobhani, 2017)
<i>Enteromorpha compressa</i>	Ag	4-24, сферические	(Ramkumar et al., 2017)
<i>Spyridia fusiformis</i>	Ag	5-50, сферические	(Murugesan, Bhuvaneshwari and Sivamurugan, 2017)
<i>Sargassum ilicifolium</i>	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	20, сферические	(Koopi and Buazar, 2018)
<i>Padina pavonia</i>	Ag	49,58-86,37, полиморфные	(Abdel-Raouf et al., 2019)
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	TiO <sub>2</sub>	50, сферические	(Sharma et al., 2018)

#### 1.3.3.4. Получение наночастиц с использованием растений

Возможность использования растений для биосинтеза НЧ была впервые показана Gardea-Torresdey и соавторами, который в 1999 году описал формирование НЧ золота в биомассе люцерны (*Medicago sativa*), предположив, что этот процесс носит биохимический характер (Gardea-Torresdey et al., 1999). Позже, этим же исследователем было показано, что растения люцерны, выращенные на средах, обогащенных хлоридом золота и нитратом серебра способны формировать соответствующие НЧ (Gardea-Torresdey et al., 2002; Gardea-Torresdey et al., 2003). В обоих случаях НЧ размером 2–20 нм аккумулировались внутри стебля растения, в особенности вдоль проводящей системы. В настоящее время изучен процесс биосинтеза НЧ у целого ряда растений, относящихся к разным таксонам, включая семейства мелиевые, яснотковые, лавровые, астровые и другие (Таблица 4) (Shankar et al. 2004; Jain and Mehata, 2017; Huang et al., 2007; Rajiv, Rajeshwari and Venckatesh, 2013). Интересно, что уровень накопления НЧ металлов в тканях растений часто оказывается значительно выше, чем в клетках микроорганизмов, что, вероятно, объясняется их более высокой устойчивостью к этим образованиям. Считается, что накопление металлов внутри растений может иметь даже положительный эффект, обеспечивая им защиту от насекомых и травоядных животных. Технология получения НЧ металлов за счет растений, поглощающих

металлы из почвы, грунтовых вод и осадков известна как фитоэкстракция (Brooks et al., 1992).

Другим примером использования растений для синтеза НЧ металлов является применение экстрактов растений. Использование различных растительных экстрактов, в том числе листьев гибискуса (*Hibiscus rosa sinensis*) (Philip, 2010), черного листового чая (Begum et al., 2009), ягод крыжовника индийского (*Emblica officinalis*) (Ankamwar, 2005), листьев камфорного дерева (*Cinnamomum camphora*) (Huang J. et al., 2007), кофе и зеленого чая (Nadagouda and Varma, 2008) и многих других приводило к эффективному синтезу НЧ золота, серебра, никеля, кадмия, свинца, хрома, меди, кремния, магния, титана и цинка с различными биологическими и физико-химическими свойствами (Таблица 4). Известно, что грубые экстракты растений содержат различные биоактивные молекулы, такие как белки, полисахариды, нуклеиновые кислоты, вторичные метаболиты и соотношение тех или иных фракций варьирует от вида к виду (Singh et al., 2018). Изучение биохимических механизмов формирования НЧ выявило важность фитохимических веществ, которые обладают биовосстановительным потенциалом в инициации нуклеации, росте и стабилизации наноструктуры (Bai et al., 2009). При этом очевидно, что каждая из фракций биомолекул вносит различный вклад в биосинтез НЧ. Было показано, что белки из экстракта листьев *Capsicum annuum* восстанавливали ионы серебра до Ag-НЧ (Li et al., 2007). Белки, содержащиеся в экстракте *Deinococcus radiodurans* использовали для получения Au-НЧ, Ag-НЧ, Au/Ag-НЧ (Li et al., 2018). Известно, что растительные полифенольные соединения также способны восстанавливать ионы металлов, так, например, флавоноиды, выделенные из экстрактов *Artemisia tilesii* и *Artemisia annua*, демонстрировали высокую восстановительную активность в отношении Ag-НЧ (Kobylinska et al., 2020). Среди прочего полисахариды растений активно используют для получения Ag-НЧ (Sarwar et al., 2015), Ag-НЧ и биметаллов (Wang et al., 2017). Что касается нуклеиновых кислот, то эти молекулы обычно не рассматривают в качестве восстановителей, однако, известно, что синтетические олиго и полинуклеотиды способны восстанавливать ионы металлов (Fu, Li and Li, 2019; Wang et al., 2010). Форму и размеры НЧ в процессе биосинтеза можно контролировать, используя различные концентрации металлов и растительных экстрактов, а также с помощью других условий проведения реакции (Dubey et al., 2010; Chandran et al., 2006).

**Таблица 4.** Получение наннчастиц металлов с использованием растений

Наименование организма	Металл	Размер (нм)/Форма	Ссылка
<i>Citrus limon</i>	ZnO, TiO <sub>2</sub>	20-200, полиморфные	(Hossain et al., 2019)
<i>Phyllanthu semblica</i>	Ag	20-93, сферические	(Masum et al., 2019)
<i>Piper nigrum</i>	Ag	9-30, кристаллические	(Paulkumar et al., 2014)
<i>Abelmoschus esculentus</i>	Au	45-75, сферические	(Jayaseelan et al., 2013)
<i>Parthenium hysterophorus</i>	ZnO	28-84, сферические и гексагональные	(Rajiv, Rajeshwari and Venckatesh, 2013)
<i>Syzygium aromaticum</i>	Cu	15, сферические	(Rajesh et al., 2018)
<i>Rosmarinus officinalis</i>	MgO	<20, звездчатые	(Abdallah et al., 2019)
<i>Matricaria chamomilla</i>	MgO, MnO <sub>2</sub>	9-112, сферические	(Ogunyemi et al., 2019a)
<i>Olea europaea</i>	ZnO	41-124, кристаллические	(Ogunyemi et al., 2019b)
<i>Lycopersicon esculentum</i>	ZnO	66-133, кристаллические	(Ogunyemi et al., 2019b)
<i>Matricaria chamomilla</i>	ZnO	50-192, кристаллические	(Ogunyemi et al., 2019b)

#### 1.3.3.5. Получение наннчастиц с использованием культур клеток растений

К настоящему времени более 100 видов растений были изучены на предмет их способности синтезировать НЧ металлов (Ferdous and Nemmar, 2020). При этом опубликовано всего несколько работ, описывающих использование для этой цели растительных клеточных культур. Между тем, культуры клеток растений можно рассматривать как более простую, доступную и контролируемую систему по сравнению с целыми дикорастущими или культивируемыми растениями. Впервые этот подход был продемонстрирован в работе Mude и соавторов, в которой с помощью экстракта каллусной культуры папайи (*Carica papaya*) были успешно получены НЧ серебра с размером 60-80 нм (Mude et al., 2009). Впоследствии НЧ металлов были получены с использованием экстрактов каллусных и суспензионных культур других растений (Таблица 5).

**Таблица 5.** Синтез НЧ металлов с использованием клеточных культур

Наименование организма	Металл	Размер (нм)/Форма	Ссылка
<i>Taxus yunnanensis</i>	Ag	6–27, сферические	(Xia, Ma and Wang, 2016)
<i>Hyptis suaveolens</i>	Ag	12–25, сферические	(Botcha and Prattipati, 2020)
<i>Sesuvium portulacastrum</i>	Ag	5–20, сферические	(Nabikhan et al., 2010)
<i>Linum usitatissimum</i>	Ag	19–54, сферические	(Anjum and Abbasi, 2016)
<i>Solanum incanum</i>	Ag	15–60, сферические,	(Lashin et al., 2021)
<i>Michelia champaca</i>	Ag, Au	5–9, сферические, триангулярные, овальные,	(Iyer and Panda, 2016)
<i>Viola canescens</i>	ZnO	9–2, гексагональные	(Khajuria et al., 2019)

Таким образом, использование культур клеток растений для получения металлических НЧ является относительно новым, простым и экологически чистым и методом биосинтеза НЧ. Стоит отметить, что одним из важных преимуществ культивируемых клеток растений является их генетическая пластичность и возможность регуляции как первичного, так и вторичного метаболизма с помощью современных методов генетической инженерии. Помимо возможности влиять на восстановительный потенциал, крупномасштабное культивирование трансгенных клеток в отличие от растений не подвергается юридическим ограничениям.

#### 1.4. Современные методы анализа наночастиц

Основными характеристиками металлических НЧ металлов являются размер, форма, кристаллическая фаза, заряд и положение пика плазмонного резонанса. Для определения данных характеристик используется широкий набор методов спектрометрии, спектроскопии, рентгеноструктурного анализа, микроскопии и других.

Спектрометрия в УФ-видимом диапазоне является основным методом первичной идентификации НЧ. Металлические НЧ проявляют эффект поверхностного плазмонного резонанса (ППР) из-за возбуждения электронов на поверхности атомов металла (Mock et al., 2002). В частности, у Ag-НЧ и Au-НЧ область положения пика плазмонного резонанса находится в диапазоне 400–450 нм и 500–550 нм, соответственно.

Инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье (Fourier-transform infrared spectroscopy, FTIR) – это метод анализа материалов, основанный на определении интенсивности инфракрасного излучения в зависимости от волнового числа (длины волны)

света. Данный метод позволяет идентифицировать отклики функциональных групп на поверхности НЧ. Эти данные позволяют выявлять биомолекулы, ответственные как за восстановление, так и стабилизацию частиц.

Элементный состав НЧ может быть установлен с помощью энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (energy-dispersive X-ray spectroscopy, EDS). Каждый элемент имеет уникальную атомную структуру, образующую уникальный набор пиков в его рентгеновском спектре, что, в свою очередь, приводит к формированию характерных сигнатур элементов (Noruziv, 2015).

Метод рентгеноструктурного анализа (X-ray powder diffraction, XRD) используется для получения информации о кристаллической структуре вещества. Метод также позволяет установить элементный состав материала и форму кристаллической решетки. На основе данных XRD с помощью уравнения Дебая – Шеррера можно рассчитать размеры кристаллического ядра частицы (Pimprikar et al., 2009). Следует отметить, что, если анализируемые частицы имеют аморфную структуру, дифракционные пики не наблюдаются.

Для визуализации НЧ применяют методы микроскопии. Самым простым способом в данной категории является сканирующая электронная микроскопия (scanning electron microscope, SEM). Данный метод отлично подходит для определения размера и формы частиц, а также характеристики их поверхности. Для более детального анализа применяют уже трансмиссионную (просвечивающую) электронную микроскопию (transmission electron microscopy, TEM). Этот метод дает возможность, в том числе, отображать особенности кристаллической решетки НЧ при разрешении, близком к 0,1 нм, что меньше межатомного расстояния (Schaffer et al., 2009). Анализ с помощью атомно-силовой микроскопии (atomic-force microscope, AFM) является лучшим выбором для непроводящих наноматериалов. Как правило, он имеет разрешение по вертикали менее 0,1 нм и разрешение по горизонтали около 1 нм. Данный метод позволяет получить информацию об электронных структурах и типах химических связей в атомах и молекулах (Das, Das and Velusamy, 2013).

Еще одним способом визуализации и анализа частиц является анализ траектории их броуновского движения в растворе (nanoparticle tracking analysis, NTA). Скорость движения зависит только от вязкости и температуры жидкости; на него не влияют плотность частиц или показатель преломления. Данный метод позволяет определять профиль распределения по размерам мелких частиц диаметром 10-1000 нм (Filipe, Hawe and Jiskoot, 2010). Кроме того, данный подход позволяет определять и величину электрического потенциала ( $\zeta$ - или дзета-потенциал) – разность потенциалов между дисперсионной средой и неподвижным слоем жидкости, прикрепленной к диспергированной частице. Величина дзета-потенциала указывает на степень электростатического отталкивания между соседними одинаково

заряженными частицами в дисперсном растворе. Для молекул и частиц, которые достаточно малы, высокий дзета-потенциал будет обеспечивать стабильность, то есть раствор или дисперсия будут сопротивляться агрегации. Когда потенциал невелик, силы притяжения могут превысить это отталкивание, и дисперсия может разрушиться с выпадением частиц из раствора в виде нерастворимых агрегатов. Таким образом, коллоиды с высоким дзета-потенциалом (отрицательным или положительным) электрически стабилизированы, в то время как коллоиды с низким дзета-потенциалом имеют тенденцию к коагуляции.

### 1.5. Применение наночастиц в медицине

Металлические НЧ, полученные с помощью различных биологических подходов нашли широкое применение в различных сферах промышленности. Ниже мы остановимся на некоторых примерах их использования в биомедицине и биотехнологии, поскольку именно в этих областях сконцентрирован интерес большинства исследователей.

**Антибактериальные свойства.** Устойчивость патогенных бактерий к антибиотикам является одной из основных причин недостаточной эффективности современных противомикробных средств. Бактериальная резистентность связана с модификацией способности микроорганизмов сопротивляться антибактериальным агентам либо путем их инактивации, либо путем снижения их терапевтической эффективности. Эта резистентность возникает у микроорганизмов спонтанно из-за генетических модификаций и затем быстро распространяется в популяции (Aslam et al., 2018). Одним из факторов, способствующих развитию резистентности является неправильное использование антибиотиков, а также злоупотребление ими. Сложившуюся ситуацию некоторые исследователи называют «идеальным» штормом, который может вернуть человечество в пост-антибиотическую эру, когда лечение простых и ставших уже привычными инфекций вновь будет сопряжено с трудностями подбора эффективных средств терапии (Gould, 2009). В этой связи поиск новых антибактериальных агентов как органической, так и неорганической природы представляется крайне важной задачей.

В настоящее время металлические НЧ являются наиболее многообещающими для решения проблемы антибиотикорезистентности. Эффективность НЧ объясняется не только механизмом действия, отличным от всех известных традиционных антибиотиков, что позволяет им преодолевать уже существующие защитные системы бактерий, но также и нацеленностью сразу на множество разных биомолекул и процессов клетки, препятствуя появлению новых резистентных штаммов.

Из всех описанных частиц, наибольшее внимание в качестве антибактериальных агентов привлекают Ag-НЧ. Само серебро в течение долгого времени использовалось в

качестве противомикробного средства для заживления ран, как в твердом состоянии, так и в солевых растворах. Опубликованные многочисленные исследования показывают, что Ag-НЧ проявляют биоцидную активность в отношении как грамотрицательных, так и грамположительных бактерий (Franci et al., 2015; Rajeshkumar et al., 2016; Wang, Hu and Shao, 2017; Ovais et al., 2019). В таблице представлены примеры антибактериальной активности Ag-НЧ. Особенно важно, что Ag-НЧ оказались эффективны в отношении опасных госпитальных инфекций с широким спектром резистентности, таких как энтеробактерии, стафилококки, энтерококки, синегнойная палочка, стрептококки, сальмонеллы и др. (Ameen F. et al., 2020; Haroon et al., 2016; Ahmadi et al., 2013). Было обнаружено, что Ag-НЧ способны проникать в биопленки и останавливать их рост, подавляя экспрессию генов (Zhao and Ashraf, 2015). Биопленки значительно повышают устойчивость микроорганизмов к антибиотикам, что еще более затрудняет борьбу с ними традиционными подходами. В частности, Ag-НЧ полученные методом биологического синтеза, были эффективны в отношении таких распространенных пленкообразующих госпитальных видов как золотистый стафилококк и акинетобактерии Баумана (Danaei et al, 2021).

Уникальные свойства Au-НЧ находят применение в таких приложениях биомедицины как бисенсорика, биоимиджинг и таргетная доставка лекарств, которые будут рассмотрены ниже. Однако антибактериальные свойства этого материала также могут найти применение благодаря тому, что Au-НЧ гораздо менее токсичны для млекопитающих по сравнению с НЧ других металлов. Некоторые примеры антибактериальных свойств Au-НЧ приведены в Таблице 6. Несмотря на приведенные примеры успешного применения Au-НЧ, многие исследователи сомневаются в антибиотическом действии чистых Au-НЧ, приписывая их действие химическим соединениям, адсорбированным на их поверхности в процессе получения и не удаленных в результате очистки (Zhang et al., 2015). Вероятно, все же чистые Au-НЧ сами по себе имеют некоторую активность, которой, однако, может быть недостаточно, чтобы рассматривать данный материал в качестве самостоятельного противомикробного средства. Более перспективным сейчас представляется подход, в котором Au-НЧ выступают в качестве нанотранспортеров лекарственных средств. Например, Jabir и соавторы использовали модифицированные Au-НЧ в качестве системы доставки линалоола. Сам по себе линалоол имеет низкую активность против грамположительных и грамотрицательных бактерий, но в комплексе с Au-НЧ проявлял выраженный антибактериальный эффект. Авторы предположили, что полученный ими комплекс действует на мембрану бактериальной клетки, что приводит к потере целостности и повышенной проницаемости клеточной стенки для действующего агента (Jabir, Taha and Sahib, 2018). В другой работе было установлено, что антибактериальная активность

канамицина и его конъюгатов с Au-НЧ против грамположительных *Staphylococcus epidermidis* и грамотрицательных *Enterobacter aerogenes* отличается, и минимальная ингибирующая концентрация конъюгата была значительно ниже, чем у свободного канамицина (Payne et al., 2016). Аналогичные выводы были сделаны и при изучении активности свободной галловой кислоты и ее конъюгата с Au-НЧ в отношении пищевого патогенного видов бактерий *Plesiomonas shigelloides* и *Shigella flexneri* (Daduang et al., 20116). Большинство исследователей сходятся во мнении, что повышение активности таких конъюгата связано в основном с повышенной адгезией действующего агента на поверхности Au-НЧ, а также увеличенной способностью конъюгатов к преодолению барьеров в виде клеточной стенки и мембраны. Кроме того, модификация Au-НЧ посредством конъюгации стабилизирует частицы, а конденсированные с высокой плотностью молекулы химического агента обладают лучшим бактерицидным действием (Тао, 2018). Интересно отметить, что, по некоторым сведениям, как Au-НЧ, так и Ag-НЧ, полученные с помощью биологических подходов имеют более выраженные антимикробные свойства (Mishra et al., 2011). Различие может заключаться в синергетическом эффекте самих нанокристаллов и компонентов растительных экстрактов, таких как вторичные метаболиты с антибактериальными свойствами, которые действуют как восстанавливающие и стабилизирующие агенты, способствуя как высокой стабильности НЧ, так и более выраженному биоцидном действию (MubarakAli et al., 2011).

**Таблица 6.** Антибактериальные свойства Ag-НЧ и Au-НЧ

Металл	Наименование организма	Размер, нм/форма	Антибактериальное действие	Действующая концентрация МІС, мг/мл	Ссылка
Ag	<i>Picea abies</i>	44 нм, сферические и полигональные	<i>Staphylococcus aureus</i>	0,05	(Tanase et al., 2019)
			<i>Escherichia coli</i>	0,23	
			<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,63	
			<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,16	
Ag	<i>Fusarium oxysporum</i>	77 нм, сферические	<i>Staphylococcus aureus</i>	0,212	(Figueiredo et al., 2019)
			<i>Escherichia coli</i>	0,106	
Ag	<i>Andrographis paniculate</i>	428 нм, сферические	<i>Escherichia coli</i>	0,125	(Hossain et al.,
			<i>Salmonella typhi</i>	0,125	
			<i>Vibrio cholerae</i>	0,125	

		и полигональн ые	<i>Enterococcus faecalis</i>	0,250	2019)
			<i>Hafnia alvei</i>	0,125	
			<i>Acinetobacter baumannii</i>	0,250	
Ag	<i>Mesoflavibacter zeaxanthinifaciens</i> CEES51	10–30 нм, сферические	<i>Bacillus subtilis</i>	0,01	(Oves et al., 2019)
Ag	<i>Seabuckthorn</i>	10–40 нм, сферические	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,002	(Gondil et al., 2019)
			<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,008	
			<i>Escherichia coli</i>	0,004	
Au	<i>Ananas comosus</i>	18 нм	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,004	(Shamail a et al., 2016)
			<i>Staphylococcus aureus</i>	0,004	
Au	<i>Mentha piperita</i>	150 нм	<i>Escherichia coli</i>	0,004	(Mubara kAli et al., 2011)
Au	<i>Salicornia brachiate</i>	25–35 нм	<i>Salmonella typhimurium</i>	0,008	(Ayaz et al., 2014)
Au	NaBH <sub>4</sub>	6–40 нм	<i>Bacillus subtilis</i>	0,008	(Shamail a et al., 2016)

Антибактериальные эффекты металлических НЧ объясняются сочетанием нескольких факторов. Во-первых, их наноразмерность и высокое отношение поверхности к объему позволяют более эффективно проникать через бактериальные мембраны. Такой способностью обладают только индивидуальные НЧ, но не их агломераты. Собственно, антибактериальное действие НЧ инициируется уже тогда, когда они непосредственно взаимодействуют с клеточными стенками бактерий. В основе взаимодействия лежат силы Ван-дер-Ваальса, электростатическое притяжение, взаимодействие по типу рецептор/лиганд и гидрофобные взаимодействия. Показано, что НЧ предпочтительнее вступают в реакции с сульфгидрильными и фосфорными группами на клеточной стенке, вызывая большие повреждения, которые приводят к высвобождению компонентов бактериальной клетки (Ahmad et al., 2016). Металлические НЧ способны проникать через внутренние мембраны, вызывая изменение ее морфологии и проницаемости, и далее воздействовать на различные метаболические пути. В частности, проникая в клетки, НЧ нарушают функции ферментов,

участвующих в синтезе белков (Vijayakumari et al., 2019). Взаимодействие с другим важным компонентом – НАДН-дегидрогеназами – приводит к генерации большого количества активных форм кислорода (АФК), которые вызывают истощение концентрации аденозинтрифосфорной кислоты и прерывают дыхательную цепь. Кроме того, АФК радикалы обладают способностью взаимодействовать с белками, а также фосфорсодержащими компонентами клеток, например, ДНК, разрушая их (Ahmad et al., 2016; Cui et al., 2012). Окислительный стресс является одним из центральных механизмов биоцидного действия металлических НЧ. Наконец, высвобождение ионов золота или серебра с поверхности НЧ может также способствовать их антимикробной активности, поскольку они способны ингибировать репликацию ДНК и влиять на активность многих жизненно необходимых белков и ферментов (Yamanaka et al., 2005). Считается, что биоцидный эффект НЧ определяется не только их концентрацией, но и размерами и формой нанокристаллов, увеличиваясь с уменьшением размера и наличием областей с высокой концентрацией атомов на единицу площади (многогранные нанокристаллы) (Chauhan, Kumar and Abraham, 2013; Manivasagan et al., 2013; Pal, Tak and Song, 2007). Так Ayala-Nunez и соавторы изучали эффективность бактерицидного действия Ag-НЧ разных размеров в отношении метициллинрезистентных штаммов *S. aureus*. Было показано, что более выраженная антибактериальная активность наблюдается у НЧ наименьшего размера (Ayala-Núñez et al., 2009). Pal и соавторы изучили зависимость антибактериального действия от формы Ag-НЧ в отношении *E. coli* и показали, что НЧ с усеченной треугольной формой оказывали более выраженный бактерицидный эффект, по сравнению с НЧ палочковидной и сферической форм (Pal, Tak and Song, 2007). Также было показано, что антибактериальный эффект зависит от используемой концентрации и времени воздействия НЧ. Кроме того, грамотрицательные бактерии (например, *E. coli*) оказались более чувствительны к воздействию НЧ по сравнению с грамположительными (*S. aureus* и *B. subtilis*) (Dror-Ehre et al., 2009; Kim et al., 2007).

**Применение в биовизуализации.** В последние годы в мире активно развиваются технологии молекулярной визуализации, которые с высокой чувствительностью и специфичностью позволяют получать ценную информацию о физиологии и патологии организма для диагностики различных заболеваний. В этой связи, НЧ благородных металлов – золота, серебра и платины – благодаря своим уникальным оптическим свойствам позволяют существенно усилить возможности современного биоимиджинга при их использовании в качестве контрастирующих агентов (Conde, Doria and Baptista, 2012).

Было показано, что использование *in vivo* Au-НЧ, покрытых молекулами полиэтиленгликоля (ПЭГ), с размером ~30 нм увеличивает контрастность изображения, что

позволяет снизить дозу облучения, а также преодолеть ограничения традиционных контрастирующих препаратов, например, соединений на основе йода (Nguyen et al., 2019). Гибридные НЧ с суперпарамагнитным ядром из оксида железа/диоксида кремния и золотой оболочкой могут быть использованы *in vivo* в качестве двойных контрастных агентов как для компьютерной, так и магнитно-резонансной томографии гепатомы, компенсируя недостатки каждого из методов (Zhou, Yuan and Wei, 2011).

Au-НЧ также нашли применение в оптической когерентной томографии – неинвазивном методе визуализации биологических тканей с разрешающей способностью менее 10 мкм. С помощью такого подхода удалось добиться повышенной контрастности и яркости при визуализации опухолей у мышей за счет преимущественного накопления нанокристаллов в опухолевой ткани (Burkitt et al., 2020). Ag-НЧ, функционализированные димерами глицина, с размерами 9–32 нм были способны свободно проникать в фиксированные препараты стволовых клеток крысы и значительно усиливать эмиссию сигнала фотolumинесценции (Kravets et al., 2016). Ag-НЧ, конъюгированные с аптамером проявляли высокую стабильность и сродство к прионам, взаимодействие с которыми фиксировали с помощью динамического светорассеяния (Zhan, Peng and Huang, 2014). Кроме того, конъюгированные с аптамером Ag-НЧ были применены для визуализации гликопротеина с использованием резонансного переноса энергии Фёрстера (Zhao, Li and Liu, 2017).

**Доставка лекарств.** Подавляющее большинство лекарств, используемых для терапии рака представляют собой низкомолекулярные соединения, которые быстро диффундируют в здоровые ткани, равномерно распределяются в организме, демонстрируют короткий период полураспада в кровотоке и высокую общую скорость выведения. Как следствие, относительно небольшие количества лекарства достигают целевого участка, а его распределение в здоровых тканях может приводить к серьезным побочным эффектам. Неэффективная доставка лекарственного средства в целевой участок часто приводит к серьезным осложнениям, таким как множественная лекарственная устойчивость (Yan, Zhang and Chen, 2016). Известно, что НЧ можно использовать в качестве векторов для нацеливания на раковые ткани/клетки, чтобы оптимизировать биораспределение лекарств. Эффективность НЧ в качестве переносчиков лекарственных средств зависит от размера и свойств функциональных групп на поверхности частиц, скорости высвобождения лекарственного средства и дезинтеграции частиц. Кроме того, эти системы демонстрируют возможность улучшенной доставки нестабильных лекарств, более точного распределения и способности избегать/обходить биологические барьеры, в том числе гематоэнцефалический (Zhou et al., 2018).

Из всех металлических НЧ, наиболее перспективными для адресной доставки считаются Au-НЧ. Это связано как с относительной биосовместимостью данных частиц, так и с их стабильностью и широкими возможностями функционализации поверхности (Dultseva et al., 2017). Например, уже нашли применение 2 нм Au-НЧ, ковалентно связанные с химиотерапевтическим препаратом паклитакселом (Gibson, Khanal and Zubarev, 2007). Интересным применением Au-НЧ является доставка малых интерферирующих РНК (миРНК) в клетки, предотвращающих трансляцию определенных белков, связанных с патогенным процессом, например, онкогенов. Примером такого рода являются Au-НЧ, конъюгированные с миРНК к гену DARPP-32 – регуляторного фосфопротеина дофаминергических клеток, благодаря чему удалось добиться ингибирования его экспрессии (Vonoiu et al., 2009). Еще одним способом использования Au-НЧ для лечения рака является фототермальная терапия. В ее основе лежит принцип направленного таргетирования Au-НЧ, функционализированных с помощью антител к определённым видам опухолевых маркеров, с последующей тепловой обработкой участка локализации неопластического образования. Последующая тепловая индукция в инфракрасном диапазоне приводит к селективной гибели опухолевых клеток. Модификацией данного подхода является создание гибридных материалов на основе магнитных и золотых НЧ. Полученные структуры сочетают в себе магнитные и оптические свойства, которые можно использовать как для фототермической терапии, так и в магниторезонансной томографии. Ag-НЧ пока не нашли широкого применения для адресной доставки. Чаще всего встречаются работы, в которых эти частицы используют в комплексе с терапевтическими средствами в целях взаимного усиления эффекта. Например, при совместном использовании *in vitro* Ag-НЧ с салиномицином или гемцитабином в культуре клеток рака яичников A2780 наблюдали более высокий уровень генерации АФК, фрагментации ДНК и высвобождения лактатдегидрогеназы по сравнению с действием чистых препаратов (Gurunathan and Zhang, 2016; Yuan and Peng, 2017). Однако высокая цитотоксичность и ограниченные возможности функционализации поверхности пока делают Ag-НЧ менее привлекательными в качестве средства доставки по сравнению с Au-НЧ.

**Биосенсоры на основе НЧ.** Многие НЧ обладают оптическими и электронными характеристиками, которые могут использоваться в биосенсорных приложениях. Zheng с соавторами описали опосредованный дрожжевыми клетками биосинтез биметаллических Au-Ag-НЧ, которые были использованы для изготовления электронно-химического сенсора ванилина (Zheng et al., 2010). Кроме того, было показано, что датчик ванилина на основе стекло-углеродного электрода, модифицированного биосинтезированными частицами, увеличивал электрохимический отклик на молекулы ванилина более чем в пять раз.

**Токсичность НЧ.** Исследования *in vitro* и *in vivo* показывают, что воздействие НЧ может вызвать образование АФК, что является преобладающим механизмом, приводящим к токсическим эффектам на клетки животных и растений. Чрезмерная генерация АФК вызывает окислительный стресс, приводящий к повреждению белков, клеточных мембран и ДНК (Sengul and Asmatulu, 2020). Продукция АФК зависит от размера, формы и состава НЧ. Обычно Au-НЧ считаются безопасными и биосовместимыми, однако, в зависимости от размера, частицы способны по-разному преодолевать клеточные барьеры, что в определенных условиях может приводить к нежелательным последствиям (Ovais et al., 201). В частности, исследование цитотоксичности Au-НЧ в отношении четырех клеточных линий (фибробласты соединительной ткани, эпителиальные клетки, макрофаги и клетки меланомы) показало, что Au-НЧ с размером 1–2 нм проявляют АФК-зависимую цитотоксичность с относительно высокими значениями полуингибирующей концентрации ( $IC_{50}$ ), тогда как уже 15 нм Au-НЧ не оказывали токсического действия в концентрациях в 60 раз превосходящих  $IC_{50}$  более мелких Au-НЧ (Pan et al., 2007). Yen с соавторами показали, что мелкие Au-НЧ приводят к уменьшению популяции макрофагов и повышают экспрессию провоспалительных генов – интерлейкина-1, интерлейкина-6 и фактора некроза опухоли альфа (Yen, Hsu and Tsai, 2009). Токсичность Au-НЧ также зависит и от их формы. В *in vivo* экспериментах на мышах Sun с соавторами показал, что наиболее токсичными являются стержневые Au-НЧ, за которыми следуют кубические частицы, в то время как сферические Au-НЧ демонстрируют очень низкую активность. Кроме того, авторы показали, что Au-НЧ преимущественно накапливаются в печени и селезенке животных (Sun et al., 2011).

Ag-НЧ обычно считаются более токсичными, по сравнению как с Au-НЧ, так и НЧ других металлов, что, среди прочего, проявляется более выраженной способностью к индукции окислительного взрыва. Ag-НЧ показали высокий уровень цитотоксичности, например, в отношении стволовых клеток, клеток печени, а также различных клеточных линий рака (Braydich-Stolle et al., 2005; Hussain et al., 2005; Soto et al., 2005; Foldbjerg, Dang and Autrup, 2011). Как и в случае с Au-НЧ, токсичность Ag-НЧ существенно возрастает с уменьшением размеров частиц (Hussain et al., 2005). Вместе с тем токсичность Ag-НЧ зависела и от формы: чем больше граней содержала кристаллическая наноструктура, тем выше была ее способность проявлять цитотоксичность (Braydich-Stolle et al., 2005). Известно, что процесс клеточной гибели, индуцированный Ag-НЧ в различных типах клеток, может протекать как по пути апоптоза, некроза, некроптоза, так и посредством аутофагии (Mohammadinejad et al., 2018). Точный механизм, определяющий судьбу клетки при воздействии НЧ, пока не известен и, по всей видимости, является суммарным эффектом многих факторов, зависящих как от свойств частиц, так и самих клеток (Zielinska et al., 2017).

## 1.6. Применение наночастиц в растительной биотехнологии

**Дезинфекция эксплантов.** Бактериальная контаминация представляет собой серьезную проблему при культивировании изолированных клеток и тканей растений в условиях *in vitro*. Сами эксплантаты, а также используемая лабораторная посуда, инструменты и питательная среда являются источником заражения (Leifert, Morris and Waites, 1994). Вегетативные и генеративные органы растений, выращенные в полевых или тепличных условиях, подвергаются поверхностной стерилизации перед введением в культуру *in vitro*. Однако во многих случаях этих процедур недостаточно, что приводит к контаминации биологического материала и, как правило, его гибели. Для стерилизации эксплантов применяют широкий спектр стерилизующих агентов, таких как бромную воду, гипохлорит натрия и кальция, этанол, пероксид водорода, хлорид ртути, нитрат серебра, антибиотики и фунгициды и др. (Leifert, Morris and Waites, 1994). Концентрация дезинфицирующих средств и время их воздействия оказывают существенное стрессовое воздействие на клетки эксплантов. Более того, уничтожение эндогенных бактерий часто является сложной задачей, поэтому часто необходимо внесение в культуральную среду дополнительных доз антибиотиков в течение длительного времени культивирования (Leifert and Cassells, 2001). При этом известно, что антибиотики оказывают фитотоксическое действие на клетки растений как *in vitro*, так и *in vivo* (Ovais et al., 2019; Qin et al., 2011). Кроме того, при длительном использовании антибиотики способны вызывать наследуемую резистентность у самих бактерий (Alavi et al., 2019; Nikaido, 2009).

Применение НЧ в качестве альтернативы антибиотикам путем внесения непосредственно в питательные среды является эффективным способом деконтаминации клеточных культур. Впервые Ag-НЧ были применены в качестве обеззараживающего агента для борьбы с бактериальным заражением эксплантов *Valeriana officinalis* (Abdi, Salehi and Khosh-Khui, 2008). В своем исследовании авторы применили комбинированный подход, в котором поверхность эксплантов последовательно дезинфицировали с помощью этилового спирта, раствора гипохлорита и препарата Ag-НЧ в концентрации 100 мг/л, что позволило получить почти полную элиминацию заражения. Более того, такая обработка не повлияла на последующее вегетативное размножение побегов и их укоренение. Похожее исследование было проведено на эксплантах *Gerbera jamesonii*, для которых обработка раствором гипохлорита натрия и 200 мг/л Ag-НЧ успешно устранила всю бактериальную инфекцию и не имела отрицательного воздействия на органогенез (Fakhrfeshani, Bagheri and Sharifi, 2012). Листовые эксплантаты *Vitis vinifera* были успешно обеззаражены этанолом и 1 г/л Ag-НЧ (Gouran et al., 2014). Семена арабидопсиса, листья картофеля и семядоли томатов обеззараживали простой обработкой эксплантов в растворе Ag-НЧ в концентрации 100 мг/л

(Mahna, Vahed and Khani, 2013). Аналогичные результаты были получены при культивировании на средах с добавлением Ag-НЧ или TiO<sub>2</sub>-НЧ побегов картофеля и табака (Safavi et al., 2011). Более того, известно, что в каллусной культуре *Vasora tonnieri* при пассировании на средах с добавлением 160 мг/л Ag-НЧ значительно снижался рост резистентной внутренней инфекции (Kalsaitkar et al., 2014).

Особенную проблему представляет устранение контаминации при введении в культуру *in vitro* древесных растений вследствие наличия твердых тканей, препятствующих эффективной обработке. Комбинированный стерилизующий подход, примененный на побегах от 9-летних оливковых растений, включавший обработку раствором этилового спирта и гипохлорита, элиминировал контаминацию только на 48%, тогда как включение в процедуру дезинфекции обработку раствором Ag-НЧ позволило полностью подавить рост нежелательной микрофлоры. Последующее внесение Ag-НЧ в культуральную среду препятствовало росту эндогенной контаминации в эксплантах оливок в течение всего времени наблюдения и не оказывало отрицательного эффекта на развитие эксплантов (Rostami and Shahsavari, 2009).

**Влияние НЧ на каллусообразование и органогенез.** Благодаря своей высокой реакционной активности и способности проникать через клеточную стенку и цитоплазматическую мембрану, НЧ металлов оказывают влияние на биохимические процессы, протекающие в растениях (Rastogi et al., 2017). Как и для большинства внешних агентов, характер воздействия – негативный или положительный определяется свойствами НЧ, их концентрацией и временем экспозиции. У растений *Tecomella undulata* эффективность побегообразования и индукции каллусов значительно увеличивалась при культивировании стеблевых эксплантов на среде с добавлением 10 мг/л Ag-НЧ (Aghdaei, Salehi and Sarmast, 2012). Положительное влияние Ag-НЧ на органогенез может быть связано с ингибированием продукции этилена – одного из растительных гормонов, который играет важную роль в регуляции роста и развития растений. Было показано, что обработка Ag-НЧ замедляла старение эксплантов и увеличивала выживаемость за счет подавления экспрессии гена *ACS*, кодирующего ацетил-КоА-синтетазу (Poulaki et al., 2020). Известно, что определенные изоформы этого гена участвуют в биосинтезе этилена, а также связаны с защитными реакциями клеток на стрессовые факторы посредством взаимодействия с сигнальным путем митоген-активируемых протеинкиназ (Poulaki et al., 2020). Добавление Ag-НЧ в концентрации 50 мг/л в питательную среду значительно улучшило ростовые характеристики проростков *Brassica juncea* благодаря снижению содержания перекиси водорода и малонового диальдегида за счет активации антиоксидантных ферментов (Sharma et al., 2012). Однако более высокие концентрации Ag-НЧ (100–400 мг/л) пагубно влияли на

рост проростков. У *Brassica nigra* добавление ZnO-НЧ (500–1500 мг/л) в среду значительно подавляло прорастание семян, а также влияло на длину побегов и корней (Zafar et al., 2016). С другой стороны, при культивировании эксплантатов *B. nigra* на среде, содержащей 1–20 мг/л ZnO-НЧ корнеобразование не было ингибировано (Zafar et al., 2016). Kumar и соавторы (Kumar et al., 2013) отмечали, что добавление Au-НЧ существенно увеличивало процент прорастания семян и скорость роста проростков *A. thaliana*. При этом длина стручков и количество семян были выше у растений, обработанных 10 мг/мл Au-НЧ.

Добавление Au-НЧ и Ag-НЧ в среду с сегментами стебля *Linum usitatissimum* увеличивало эмбриогенез на 70% и 50%, соответственно (Kokina et al., 2013). Авторы подтвердили накопление НЧ в клетках и предположили, что растения активно поглощают металлические НЧ, однако, фактический механизм, с помощью которого НЧ усиливают эмбриогенез, остался неясен и требует дальнейшего изучения. Fazal с соавторами (Fazal et al., 2016) изучали влияние индивидуальных НЧ золота и серебра, а также их комбинации на пролиферацию каллусов у *Prunella vulgaris*. Было показано, что Ag-НЧ (30 мг/л), Ag-НЧ:Au-НЧ в соотношениях 1:2 и 2:1 в сочетании с ауксином усиливали пролиферацию каллуса на 100%, по сравнению с контролем.

**Влияние НЧ на вторичный метаболизм.** Растения синтезируют широкий спектр биологически активных вторичных метаболитов, которые играют важную роль для выживания растений в окружающей их среде. В биотехнологии культуры клеток лекарственных растений являются альтернативным продуцентом для крупномасштабного производства ценных соединений. Содержание вторичных метаболитов в культуре клеток можно регулировать с помощью классических биотехнологических способов, например, оптимизации состава культуральной среды, добавления предшественников и элиситоров, а также обеспечения соответствующих условий культивирования (Hussain et al., 2012). В качестве новых активаторов вторичного метаболизма большое внимание исследователей привлекают и НЧ различных металлов. Добавление Ag-НЧ в каллусную культуру *Calendula officinalis* стимулировало накопление эфирного масла (Iqbal et al., 2015). TiO<sub>2</sub>-НЧ значительно активировали биосинтез галловой, хлорогеновой, кумаровой, дубильной и коричной кислот в зародышевых каллусах *Cicer arietinum* (Ashraf et al., 2015). Применение биметаллических Au/Ag-НЧ вызывало повышенное накопление флавоноидов в каллусах *P. vulgaris* (Fazal et al., 2016). Syu и соавторы (Syu et al., 2014) изучили влияние формы Ag-НЧ на продукцию антоцианов в культуре арабидопсиса и установили, что сферические Ag-НЧ обладали наибольшей стимулирующей активностью в отношении накопления антоцианов.

Fatima с соавторами (Fatima et al., 2020) исследовали потенциал Ag-НЧ для увеличения продукции артемизинина в культурах бородатых корней *A. annua*. Было

показано, что под действием 900 мг/л Ag-НЧ биосинтез артемизинина увеличивался в четыре раза. Похожие результаты были получены и при обработке суспензионной культуры клеток *A. annua* 5 мг/л Co-НЧ (Ghasemi, Hosseini and Nayeri, 2015). Авторам удалось достичь двукратного увеличения выхода артемизинина уже через сутки после обработки. Было также отмечено, что присутствие Co-НЧ ингибировало экспрессию генов сквален-синтазы (*SQS*) и дельта-11(13) редуктазы артемизининового альдегида (*DBR2*). Артемизинин является ценным антималярийным препаратом, но фермент *SQS* направляет вторичный метаболизм *A. annua* на продукцию сквалена, который не имеет такой фармакологической активности. В этой связи генетические и иные подходы, направленные на супрессию экспрессии *SQS*, являются важным инструментом для создания рентабельного биотехнологического штамма-продуцента. Важно отметить, что элиситорная активность НЧ превосходит таковую у простых солей соответствующих металлов. Например, Ag-НЧ вызывали наибольшее увеличение продукции атропина в культурах бородатых корней *Datura metel* по сравнению с нитратом серебра, а также с воздействием других известных элиситоров (Shakeran et al., 2015).

Резюмируя вышесказанное можно отметить, что НЧ представляют большой интерес для их использования в оптических, электронных, медицинских, каталитических и биотехнологических приложениях. Синтез и характеристика металлических НЧ стали важной отраслью нанотехнологии, особенно в сфере получения наноструктур благородных металлов, таких как Au, Ag, Pd и Pt. Функциональные свойства и использование этих материалов зависят от их состава и структуры, и поэтому интерес к НЧ металлов в настоящее время сосредоточен на разработке новых методов их синтеза, которые позволяли бы контролировать синтез НЧ с определенным размером и формой. В последние десятилетия использование биологических систем (включая бактерии, грибы, водоросли, растения) также стало новой технологией синтеза различных НЧ в попытке контролировать форму, состав, размер и монодисперсность НЧ. При этом, потенциал клеточных культур растений, а также генетических способов регуляции метаболизма клеток для биосинтеза металлических НЧ с полезными свойствами остается мало изученным и требует дальнейшего исследования.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Материалы

Для культивирования растительных клеток в условиях *in vitro* использовали жидкую или агаризованную модифицированную питательную среду Т. Мурасига и Ф. Скуга (МС) (Таблица 7), в которой количество соли  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  было снижено в 4 раза (Murashige and Skoog, 1962). Бактериальные штаммы выращивали на среде Лурия-Бертани (ЛБ) (Таблица 8). Культуры мицелиальных грибов растили на картофельно-декстрозном агаре (Таблица 9). Все среды перед использованием стерилизовали в автоклаве при  $t = 120^\circ\text{C}$  и давлении 0,8–1,0 атм в течение 20 минут.

**Таблица 7.** Компоненты питательной среды для растительных культур

Компонент	Содержание, мг/л
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	400
$\text{KNO}_3$	1900
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	170
$\text{CaCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	665
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	370
$\text{H}_3\text{BO}_4$	6,2
$\text{MnSO}_4 \times 4 \text{H}_2\text{O}$	22,3
$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$	0,025
$\text{CoCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	0,025
$\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	8,6
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	0,25
KJ	0,83
$\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	27,8
$\text{Na}_2\text{EDTA} \times 2 \text{H}_2\text{O}$	37,3
Мезо-инозит	100
Тиамин гидрохлорид	0,2
Никотиновая кислота	0,5
Пиридоксин гидрохлорид	0,5
Казеин гидролизат	100
Сахароза	30000
Агар	6000

**Примечание.** pH среды 5,6 – 5,8 довели при помощи 5% KOH перед автоклавированием.

**Таблица 8.** Компоненты питательной бактериальной среды ЛБ

Компонент	Содержание, г/л
NaCl	10
Пептон	10
Дрожжевой экстракт	5

**Примечание.** pH среды 7,5 довели при помощи 5% NaOH перед автоклавированием

**Таблица 9.** Состав картофельно-декстрозного агара

Компонент	Содержание, г/л
Картофель	400
Декстроза	20
Агар	20

**Культуры клеток растений.** Клеточная культура воробейника краснокорневого *L. erythrorhizon* ВК-39 была получена и описана ранее (Bulgakov et al., 2001). Каллусы культивировали на твердых питательных средах (Таблица 7), с добавлением 2,0 мг/л кинетина, 0,2 мг/л ИУК и 0,25 мг/л CuSO<sub>4</sub>, в темноте при 25 °С с 30-дневными интервалами субкультивирования.

Трансгенные каллусы и растения *N. tabacum*, экспрессирующие ген  $\alpha$ -силикатеина *LoSilA1* из морской губки *Latrunculia oparinae*, были получены и описаны ранее (Shkryl et al., 2017). Нетрансформированные и трансгенные каллусы культивировали на твердых питательных средах (Таблица 7), с добавлением 2 мг/л АНУ и 0,5 мг/л 6-БАП, в темноте при 25 °С с 30-дневными интервалами субкультивирования. Стерильные растения табака выращивали на твердой питательной среде того же состава, но без добавления гормонов, со сниженным содержанием сахарозы (10 г/л) и с уменьшенным вдвое количеством всех макросолей. Растения культивировали при 25 °С, световом режиме 16/8 (день/ночь) в течение 30 дней.

Клеточная линии женьшеня настоящего *P. ginseng* нетрансформированная (1с), трансгенные каллусы и культура бородатых корней, экспрессирующие ген *rolC* из Т-ДНК *pRi* плазмиды бактерий *Rhizobium rhizogenes*, были получены и описаны ранее (Bulgakov et al., 1998). Каллусы и бородатые корни культивировали на агаризованной и жидкой средах МС (Таблица 7), соответственно, с добавлением 0,4 мг/л 4-ХФУ. Все культуры содержали в темноте при 25 °С. Бородатые корни непрерывно перемешивали на орбитальном шейкере со скоростью 80 об/мин. Культуры клеток женьшеня выращивали в течение 25–28 дней.

В работе также были использованы каллусные культуры марены сердцелистной *R. cordifolia* (R), резуховидки Таля *A. thaliana* (At), винограда культурного *V. vinifera* (Vv) и артишока испанского *Cynara cardunculus* (Cyn), полученные и описанные ранее (Bulgakov et al., 2002; Bulgakov et al., 2012; Makhazen et al., 2021; Vereshchagina et al., 2014). Каллусы культивировали на агаризованных питательных средах (Таблица 7) с добавлением 2 мг/л АНУ (0,5 мг/л – для At) и 0,5 мг/л 6-БАП, в темноте при 25 °С с 30-дневными интервалами субкультивирования.

**Культуры клеток млекопитающих.** Клеточную линию эмбриональных фибробластов мыши NIH 3T3 и линию клеток нейробластомы мыши N2A культивировали в культуральных флаконах 75 см<sup>2</sup> (Eppendorf, Германия) с использованием смеси питательных сред DMEM/F12 (Gibco®, США), объединенных в соотношении 1:1 (об/об), с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки. (FBS), 1x раствора антибиотика-антимикотика (Gibco®, США), содержащего 1000 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 0,25 мкг/мл амфотерицина В. Клетки инкубировали при 37 °С в инкубаторе, увлажненном 5% диоксидом углерода, до достижения 70-80%-ной конфлюэнтности. Клетки промывали натрий-фосфатным буфером (0,8% NaCl, 0,02% KCl, 10 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4) и обрабатывали 0,25% раствором трипсина (Gibco®, США). После сбора, клетки высевали в три 96-луночных планшета на каждую исследуемую культуру с плотностью посадки по 8000 клеток на лунку для анализа цитотоксичности, а 3T3 дополнительно высевали в 24-луночный планшет в количестве 60000 клеток на лунку для анализа подвижности. Оценка количества клеток производилась в счетной камере.

Линию клеток С6 глиомы крысы культивировали в колбах на 25 см<sup>2</sup> (Eppendorf, Германия) на среде DMEM (Gibco®, США) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (Gibco®, США) и 1% антибиотика-антимикотика (Gibco®, США), содержащего пенициллин, стрептомицин и амфотерицин В при 37 °С в инкубаторе, увлажненном 5% диоксидом углерода, до достижения 80%-ной конфлюэнтности.

**Культуры клеток бактерий.** Бактериальные штаммы грамотрицательных бактерий *E. coli* XL-1 Blue и *Agrobacterium tumefaciens* ЕНА105 культивировали в жидких или агаризованных питательных средах ЛБ (Таблица 8) при 37 °С или 28 °С, соответственно.

**Изоляты грибов.** Грибные патогены пшеницы (*Triticum aestivum* L.) выделяли из семян с симптомами фузариоза. Образцы семян были собраны на селекционно-опытных станциях ФГБНУ Дальневосточный научно-исследовательский институт сельского хозяйства (г. Хабаровск, Россия) в 2019 году. Образцы помещали в чашки Петри, содержащие картофельно-декстрозный агар (Таблица 9) с добавлением стрептомицина в концентрации 250 мг/л для предотвращения бактериального заражения и культивировали при 28 °С в темноте. При появлении зачатков мицелия, кончики гиф переносили в асептических условиях на свежие чашки Петри и культивировали при тех же условиях. Каждую вновь образованную грибную колонию пассировали отдельно до получения чистых изолятов.

Образцы ДНК из 22 изолятов выделяли с использованием коммерческого набора для выделения геномной ДНК из клеток, тканей и крови (Биолабмикс, Россия). Для определения таксономической принадлежности грибов, проводили ПЦР с использованием праймеров FoTub-F и FoTub-R, специфичных к последовательности гена β-тубулина (Таблица 10), и

коммерческим набором Encyclo polymerase mix при условиях амплификации, описанных ранее (Balabanova et al., 2019). Полученные продукты амплификации секвенировали с помощью генетического анализатора ABI 3500 (Applied Biosystems, США) с помощью набора BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit согласно рекомендациям фирмы-производителя. Полученные последовательности депонировали в базу данных GenBank.

**Полисахариды морских водорослей.** Полисахариды ламинаран (ScL) и фукоидан (ScF) из водорослей *Sacharina cichorides*, фукоидан (FeF) и альгинат (FeA) из *Fucus. evanescens* были выделены и охарактеризованы по ранее разработанному методу сотрудниками лаборатории химии ферментов Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г. Б. Елякова Дальневосточного отделения Российской академии наук (ТИБОХ ДВО РАН) (Sokolova et al., 2011). Общее количество полисахаридов, в выделенных образцах определяли с помощью фенол-серно кислотного метода (Dubois et al., 1956). После гидролиза полисахаридов в 2 М трифторуксусной кислоте при 100 °С в течении 6 часов и получения производных альдитолацетата определяли моносахаридный состав методом газожидкостной хроматографии. Количество сульфатных групп определяли желатиновым методом (Dodgson, 1961). Спектры ядерно-магнитного резонанса получали на спектрометре Avance DPX-500 NMR (Bruker, США) при 35 °С и 60 °С с использованием метанола в качестве внутреннего стандарта. Концентрация образца составляла 15 мг/мл.

Анализ спектров ядерно-магнитного резонанса FeA показал специфичные сигналы для альгинатов водорослей, соответствующие 1,4-связанным остаткам β-D-маннуроносовой кислоты и менее интенсивные пики для 1,4-связанных остатков α-L-гулууроносовой кислоты. Выход полисахаридов FeA составил 18% от массы сухой обезжиренной водоросли.

Ламинаран ScL являлся 1,3/1,6-β-D-глюканом с соотношением связей 1,3:1,6 = 9:1. Этот полисахарид содержал основную цепь из 1,3-связанных остатков глюкозы с одинарными разветвлениями у C6.

Оба фукоидана, FeF и ScF были сульфатированными фуканами с различающимися типами связей между остатками фукозы (1,3- и 1,4- для FeF; 1,3- для ScF) и степенью содержания сульфата (27% для FeF и 36% – для ScF). Фукоидан FeF также содержал ацетильные группы. FeF представлял собой слаборазветвленный фукан, у которого сульфатные группы были обнаружены в основном в положении 2 и реже – в положении 4. Фукан ScF имел основную цепь преимущественно с 1,3-связанными остатками фукозы, которой сульфаты находились в положениях 2 и 4.

## 2.2. Реактивы

В работе использовали реактивы для электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ),  $\beta$ -меркаптоэтанол, (BioRad, США); бычий сывороточный альбумин (New England Biolabs, США); агарозу, бромистый этидий (Helicon, Россия); индол-3-уксусной кислоту (ИУК), альфа-нафтилуксусную кислоту (АНУ), 6-бензил-аминопурин (6-БАП), 4-хлорфеноксиуксусную кислоту (4-ХФУ), кинетин (Sigma, США); трифторуксусную кислоту (ТФУ) (Merck, Германия); нитрат серебра ( $\text{AgNO}_3$ ), хлористоводородную кислоту ( $\text{HAuCl}_4$ ) (Sigma, США); стандарты молекулярных масс белков Precision Plus Protein Unstained Protein Standard (BioRad, США); ДНК-маркер 100 bp и 1 kb (Сибэнзим, медную сетку, покрытую углеродом 3250С (SPI, США); фильтр GE Whatman 0,45 мкм (GE Healthcare, США); олигонуклеотиды, синтезированные фирмой ЗАО «Евроген» (Россия) (Таблица 10).

**Таблица 10.** Нуклеотидные последовательности, использованных в работе праймеров

Название праймера	Последовательность (5'–3')	Назначение
ITS-F	GGAAGKARAAGTCGTAACAAGG	Установление целостности ДНК с помощью специфической амплификации внутреннего транскрибированного спейсера (ITS)
ITS-R	RGTTTCTTTTCCTCCGCTTA	
FoTub-F	GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC	Уточнение таксономической принадлежности изолятов грибов на основе частичной последовательностей гена $\beta$ -тубулина
FoTub-R	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC	

### 2.3. Оборудование

В данной работе использовали следующее оборудование: шейкер-инкубатор ES-20 (BioSan, Латвия), центрифугу Allegra X-22 (Beckman Coulter, США), микрообъемный УФ-видимый спектрофотометр BioSpec-nano (Shimadzu, Япония), амплификатор C1000 Thermal Cycler (BioRad, США), камеру для вертикального электрофореза Mini-PROTEAN TetraCell (BioRad, США), камеру для горизонтального электрофореза Mini-SUB Cell GT (BioRad, США), систему гель-документирования Gel VersaDoc MP 5000 (BioRad, США), ЯМР-спектрометр Avance DPX-500 NMR spectrometer (Bruker, США), аналитическую систему ВЭЖХ 1260 Infinity (Agilent Technologies, США), масс-спектрометр с ионной ловушкой HCT ultra PTM Discovery System (Bruker Daltonik GmbH, Германия), генетический анализатор ABI3130 (Agilent, США), систему Nanosight NS500 (NanoSight, Великобритания), микроскоп Libra 200 (Carl Zeiss, Германия), дифрактометр Miniflex II (Rigaku, Япония), сортировщик клеток MoFlo Astrios EQ (Beckman Coulter, США), микропланшетный ридер (iMark™, Bio Rad, США), платформу Cell-iQ® для высокопроизводительной визуализации (Chip-Man Technologies Ltd, Финляндия). Значительная часть экспериментальной работы была выполнена с использованием оборудования, входящего в состав ЦКП “Биотехнология и генетическая инженерия” на базе ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН.

### 2.4. Методы

**Получение экстрактов из культур растительных клеток.** Для получения экстрактов из клеточных культур и растений *L. erythrorhizon*, *P. ginseng* и *N. tabacum* использовали свежие или высушенные (при 60 °С в течение 5 ч) линии, собранные в конце пассажа. Образцы растирали в стерильной воде Milli-Q® в соотношении 1/5 или 1/50 (вес/об), соответственно, при комнатной температуре или кипятили при 100 °С в течение 5 минут. Полученную смесь центрифугировали при 20000 g, после чего супернатант фильтровали через мембранные фильтры Whatman с диаметром пор 0,45 мкм (GE Healthcare, Калифорния, США) и использовали для синтеза НЧ металлов.

**Выделение и анализ нуклеиновых кислот, белков и полисахаридов из экстракта каллусной культуры *L. erythrorhizon*.** Для осаждения нуклеиновых кислот к водному экстракту из каллусов *L. erythrorhizon* добавляли 3 объема абсолютного этанола и инкубировали при –20 °С в течение часа. ДНК осаждали центрифугированием при 20000 g в течение 20 минут, сушили на воздухе и затем растворяли в воде. Образцы ДНК анализировали с помощью электрофореза в 1% агарозном геле, содержащем 0,2 мг/мл бромистого этидия и визуализировали в УФ-свете. Концентрацию ДНК оценивали путем

измерения оптической плотности при 260 нм. Для проверки целостности ДНК была проведена полимеразная цепная реакция (ПЦР) с неразбавленным образцом ДНК и его разведениями в воде в соотношении 1:5, 1:10 и 1:50 (об/об) с использованием пары праймеров ITS-F и ITS-R, специфичных к последовательности внутреннего транскрибированного спейсера (ITS) (Таблица 10) и набором Encyclo polymerase mix с условиями амплификации, описанными ранее (Balabanova et al., 2019). Аликвоты продуктов реакции (7 мкл) анализировали с помощью электрофореза в 1% агарозном геле.

Для выделения общей фракции белков из экстракта каллусов *L. erythrorhizon* раствор смешивали с 4 объемами ацетона и инкубировали при  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение ночи. Белки осаждали центрифугированием (20000 g, 30 минут,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), ресуспендировали в однократном буфере Лэммли и анализировали с помощью ПААГ электрофореза в 12,5% геле последующим окрашиванием бриллиантовым синим Кумасси G-250 в смеси 50% этилового спирта и 10% ледяной уксусной кислоты. Раскрашивание геля осуществляли в растворе, содержащем 10% этилового спирта и 5% ледяной уксусной кислоты, до появления явно различимых белковых спектров на дорожках. Концентрацию белков в образцах определяли методом Брэдфорд (Bradford, 1976). Для построения калибровочной кривой использовали бычий сывороточный альбумин в качестве стандарта (New England Biolabs, США).

Полисахариды выделяли из экстракта в течение ночи с использованием 3 объемов абсолютного этанола. После центрифугирования при 20000 g в течение 20 минут осадок ресуспендировали в воде и обрабатывали в течение 2 часов 10 Ед/мл ДНКазы I при  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , чтобы исключить загрязнение геномной ДНК. Общее количество полисахаридов измеряли фенол-сернокислотным методом, описанным ранее (Dubois et al., 1956).

**Хроматография и масс-спектрометрия вторичных метаболитов.** Качественный и количественный анализ вторичных метаболитов экстрактов анализировали с помощью масс-спектрометрии высокого разрешения на приборе Shimadzu LCMS-IT-TOF (Япония) в режиме отрицательных ионов в условиях ионизации электрораспылением. УФ-видимые спектры и данные фрагментации  $\text{MS}^2$  были получены с использованием аналитической системы ВЭЖХ 1260 Infinity (Agilent Technologies, США), сопряженной с матричным фотодиодным детектором G1315D и масс-спектрометр с ионной ловушкой низкого разрешения НСТ ultra PTM Discovery System (Bruker Daltonik GmbH, Германия). Хроматографическое разделение проводили с использованием колонок для ВЭЖХ с обращенной фазой. Все определенные компоненты экстрактов были идентифицированы на основе данных УФ-видимой спектроскопии и масс-спектрометрии, последовательного хроматографического разделения с использованием колонки с обращенной фазой и их сравнения с литературными данными.

Количественное определение основных компонентов проводили с использованием внешних стандартов.

**Получение НЧ металлов.** Для получения НЧ металлов экстракты клеточных линий и растений смешивали с 1 мМ растворами предшественников – нитрата серебра ( $\text{AgNO}_3$ , Sigma-Aldrich) или хлористоводородной кислоты ( $\text{HAuCl}_4$ , Sigma-Aldrich), в соотношении 1:10 (об/об). Биметаллические Ag/Au-НЧ получали смешиванием растворов  $\text{AgNO}_3$  и  $\text{HAuCl}_4$  в молярных соотношениях 1:1, 1:4 и 4:1 (конечный объем 9 мл) с 1 мл экстракта каллусной культуры *L. erythrorhizon* ВК-39. Реакцию восстановления проводили при 25 °С в течение 24 часов, с постоянным перемешиванием (150 г) и освещением (холодная белая люминесцентная лампа мощностью 11 Вт) или в темноте. После инкубации НЧ трижды промывали в дистиллированной воде с последующим центрифугированием при 20000 г в течение 20 минут. При микроволновом синтезе образцы нагревали в течение 5 минут в микроволновой печи (LG МН-6353Н), работающей при мощности 800 Вт и частоте 2450 МГц.

Чтобы оценить восстановительный потенциал нуклеиновых кислот, белков, полисахаридов и вторичных метаболитов, выделенных из экстракта *L. erythrorhizon*, выделенные фракции смешивали с 1 мМ  $\text{AgNO}_3$  в соотношении 1:10 (об/об). Реакцию восстановления проводили при 25 °С в течение 24 часов, с постоянным перемешиванием (150 об/мин) и постоянном освещении.

Для получения Ag-НЧ, с использованием полисахаридов бурых водорослей, навески по 10 мг каждого из полисахаридов растворяли в 100 мл 1 мМ водного раствора нитрата серебра ( $\text{AgNO}_3$ ) с постоянным помешиванием (150 об/мин) при комнатной температуре. рН полученных растворов доводили до 10–11 с помощью 5% раствора КОН. После этого реакционную смесь нагревали до 70 °С в течение получаса при постоянном помешивании. НЧ, синтезированные с помощью полисахаридов – ламинарана (ScL) и фукоидана (ScF) из *S. cichorides*, фукоидана (FeF) и альгината (FeA) из *F. evanescens*, были обозначены как Ag-НЧ-ScL, Ag-НЧ-ScF, Ag-НЧ-FeF и Ag-НЧ-FeA, соответственно. Затем НЧ центрифугировали при скорости 20000 г в течение 20 минут и промывали стерильной дистиллированной водой.

Для определения концентрации полученных металлических и биметаллических НЧ аликвоты (1 мл) каждого образца высушивали под вакуумом с помощью вакуумного концентратора Concentrator plus (Eppendorf, Германия) и взвешивали полученный осадок на аналитических весах.

**Спектрофотометрия.** Спектры поглощения измеряли с помощью спектрофотометра BioSpec-nano (Shimadzu, Япония) в диапазоне 200–800 нм. Для измерения использовали аликвоты реакционных смесей (2 мкл), которые анализировали при длине оптического пути

0,7 мм. Аликвоты реакционных смесей (50 мкл) также анализировали с помощью спектрофотометра SmartSpec™ Plus (Bio-Rad, Калифорния, США). Для проведения длительных экспериментов использовали планшетный спектрофотометр Benchmark Plus (Bio-Rad, Калифорния, США).

**ИК-спектроскопия с преобразованием Фурье.** Анализ ИК-спектроскопии с преобразованием Фурье проводили на спектрометре Nicolet 6700 (Thermo Electron, США) при комнатной температуре в диапазоне 4000–400 см<sup>-1</sup> с разрешением 3 см<sup>-1</sup> в гранулах бромида калия (KBr).

**Анализ траектории броуновского движения НЧ в растворе.** Гидродинамический диаметр и дзета-потенциал НЧ в водном растворе определяли посредством анализа траектории движения НЧ с использованием системы Nanosight NS500 (NanoSight, Великобритания) в соответствии с инструкциями производителя. Перед анализом образцы разбавляли водой для получения примерно 20 частиц на изображение. Измерения проводились при комнатной температуре и 60-секундном захвате частиц при броуновском движении. Полученные видео (10 видео на образец) были обработаны и проанализированы с помощью аналитического программного обеспечения NTA версии 2.2. Для оценки дзета-потенциала использовался сценарий видеозаписи и разработанный производителем анализ.

**Электронная микроскопия.** Морфологию полученных НЧ характеризовали с помощью сканирующей электронной микроскопии (SEM) с помощью микроскопа Hitachi S-5500 (Япония) при ускоряющем напряжении 2,0 кВ. Также изображения НЧ были получены при помощи трансмиссионной электронной микроскопии (TEM) на микроскопе Libra 200 (Carl Zeiss, Германия). Образцы НЧ диспергировали в этаноле с помощью ультразвуковой ванны IC1216-40-12 (Branson, США) в режиме ультразвукового диспергирования в течение 3 часов при 25 °С. Для визуализации НЧ каплю дисперсионного раствора помещали на медную сетку, покрытую углеродом 3250С (SPI, США).

**Рентгеноструктурный анализ.** Определение кристаллической структуры НЧ производили посредством рентгеноструктурного анализа. Рентгенограмму записывали с помощью дифрактометра Miniflex II (Rigaku, Япония), работающего при 30 кВ с током 15 мА и излучением Cu/Kα в диапазоне 3°-80° в 2θ углах. Средний размер полученных НЧ рассчитывали, используя уравнение Шеррера:

$$D = 0,94 \lambda / \beta \cos\theta,$$

где  $\lambda$  – это длина волны рентгеновского излучения (1,5418 Å),  $\beta$  – ширина рефлекса на полувысоте и  $\theta$  – это угол дифракции (брэгговский угол).

**Энергодисперсионная спектроскопия.** Определение элементного анализа НЧ проводили с помощью спектрометра EDX-800HS-P (Shimadzu, Киото, Япония), оснащенного

рентгеновской трубкой с родием (настройки: вакуум, напряжение 50 кВ, ток 100 мкА, время измерения – 300 секунд, мертвое время – 20%, коллиматор 10 мм). Данные были проанализированы с использованием программного обеспечения PCEDX Shimadzu.

**Изучение цитотоксической активности НЧ с помощью МТТ анализа.** Клетки экспериментальных линий (3Т3, N2А или С6) промывали в натрий-фосфатном буфере (0,8% NaCl, 0,02% KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4) и обрабатывали 0,25% трипсином (Gibco®, США). После сбора культуры высевали в два 96-луночных планшета с  $0,7 \times 10^4$  клеток на лунку. Подсчет клеток проводили с помощью сортера MoFlo Astrios EQ (Beckman Coulter, США). Через 24 ч инкубации к клеткам в 96-луночные планшеты добавляли разные концентрации (1, 5, 12,5, 25, 50 или 100 мкг/мл) Ag-НЧ или Au-НЧ, полученных с использованием экстракта *L. erythrorhizon*, и кокультивировали в течение 24 часов для изучения их цитотоксичности.

После инкубации клеток с разными типами и концентрациями НЧ в лунки вносили раствор тиазолила синего тетразолия бромида (МТТ) (0,5 мг/мл) в соотношении 1/10 (об/об) и инкубировали 4 часа при 37 °С. Затем раствор удаляли и к клеткам добавляли 150 мкл лизирующего буфера (4 mM HCl с изопропанолом, 1% NP-40) для растворения образовавшихся кристаллов формазана, после чего лизаты инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре. Затем планшеты центрифугировали в течение 10 минут при 1000 об/мин (Eppendorf® Centrifuge 5804-R, Германия) и по 100 мкл супернатанта из каждого образца переносили в новую лунку. Оптическую плотность измеряли с помощью микропланшетного ридера (iMark™, Bio Rad, США) при 595 нм и 655 нм. Результаты представлены в виде средней выживаемости клеток в % по результатам 3 измерений.

**Определение скорости миграции клеток в присутствии НЧ.** Для отслеживания активности пролиферации использовали метод высокопроизводительной визуализации клеток на платформе Cell-iQ® (Chip-Man Technologies Ltd, Финляндия). Клетки фибробластов мыши, посеянные в 24-луночные планшеты с плотностью  $2,8 \times 10^4$  клеток на лунку и обработанные НЧ, инкубировали в 5% CO<sub>2</sub> при 37 °С и отслеживали в течение 44 часов до формирования монослоя контрольными клетками. Результаты представлены в виде индекса пролиферации, рассчитанного как отношение суммы клеток всех поколений к исходному количеству посеянных клеток.

IC<sub>50</sub> НЧ, полученных с использованием экстракта *L. erythrorhizon*, необходимая для подавления клеточного роста, была рассчитана на основе данных о жизнеспособности клеток в присутствии Ag-НЧ, а также биметаллических Ag/Au-(1:1)-НЧ и Ag/Au-(4:1)-НЧ с помощью Graphpad Prism v 6.0 (США). Удельные концентрации Au-НЧ и биметаллических

Ag/Au-(1:4)-НЧ, использованные в анализе, составляли 17,5 мкг/мл и 100 мкг/мл, соответственно.

**Изучение антибактериальной активности Ag-НЧ.** Для изучения антибактериальной активности полученных Ag-НЧ, в отношении двух грамотрицательных бактерий *E. coli* XL1-Blue и *A. tumefaciens* ЕНА105 использовали диско-диффузионный метод. Свежие бактериальные культуры культивировали в течение 24 ч при 37 °С (*E. coli*) или 28 °С (*A. tumefaciens*) на среде ЛБ (Таблица 8). Каждую бактериальную культуру, содержащую  $1 \times 10^6$  КОЕ/мл, растирали по чашке Петри с агаризованной средой ЛБ (Таблица 8).

Стерильные бумажные диски диаметром 5 мм, пропитывали различными концентрациями НЧ, затем давали им высохнуть при комнатной температуре. Диски помещали на чашки с агаром, засеянным соответствующими бактериями и инкубировали в перевернутом положении при соответствующей температуре в течение 24 часов. После инкубации проводили измерение зоны свободной от бактериальных клеток (зону ингибирования) от края до края очищенной области. Эксперименты проводили в трех повторах. Для выявления взаимосвязи между концентрациями Ag-НЧ и диаметром наблюдаемых зон ингибирования использовали корреляционный анализ Пирсона с помощью программы Statistica 10.0 (StatSoft Inc., Техас, США).

Кинетику роста бактерий в присутствии Ag-НЧ (1, 5, 10 и 20 мкг/мл), полученных с использованием экстракта *LoSiLA1*-трансгенного каллуса, определяли путем измерения оптической плотности при 600 нм в течение 25 часов при помощи планшетного спектрофотометра Benchmark Plus (Bio-rad, калифорния, США). Эксперименты проводили в трех повторах.

**Изучение фунгицидной активности Ag-НЧ.** Фунгицидное действие Ag-НЧ, полученных с использованием экстракта бородатых корней *P. ginseng*, оценивали в отношении изолированных и идентифицированных фитопатогенных грибов пшеницы, а именно *Fusarium graminearum*, *F. poae*, *F. avenaceum* и *F. sporotrichioides*. Для определения ингибирования роста мицелия штаммы грибов инкубировали на картофельно-декстрозном агаре (Таблица 9), с добавлением различных концентраций Ag-НЧ (5, 25, 50, 75 и 100 мкг/мл). Споры грибов инокулировали в центр каждой чашки Петри и инкубировали в течение 7 дней при 28 °С в темноте. Чашки без НЧ и чашки, содержащие только экстракт бородатых корней женьшеня, использовали в качестве контролей. Процент ингибирования радиального роста (ИРР) рассчитывали, как разницу между диаметром мицелия контрольных и экспериментальных чашек относительно роста мицелия в контроле. Эксперименты проводили в трех повторах.

**Стерилизация зараженных семян пшеницы с помощью наночастиц серебра, полученных с использованием экстракта бородатых корней *P. ginseng*.** Инфицированные семена пшеницы сортов Лира 98 x 334-84, Далира и Хабаровчанка x Монакинка с симптомами фузариоза помещали в раствор Ag-НЧ без какой-либо предварительной обработки или промывки. Был протестирован фунгицидный эффект Ag-НЧ в концентрациях 100, 150 и 200 мкг/мл. Для сравнения в качестве положительного контроля использовали 0,2 % раствор диоксида (водная смесь этанолбромид ртуты (1 часть) и N-цетилпиридиния хлорида (2 части)), который традиционно используется в качестве антисептического раствора. Необработанные семена использовали в качестве отрицательного контроля. Семена выдерживали в растворе Ag-НЧ 1 час или 20 часов, или обрабатывали раствором диоксида в течение 3–5 минут. После обработки семена трижды промывали стерильной водой в течение 5 минут и помещали в твердую среду МС (Таблица 7) без гормонов при 24 °С со световым режимом 16/8 (день/ночь). Для каждого условия эксперимента использовали по десять зерен, эксперименты проводили в трех биологических повторностях.

**Изучение элиситорной активности Ag-НЧ.** Элиситорную активность Ag-НЧ, полученных с использованием экстракта *L. erythrorhizon*, в отношении биосинтеза вторичных метаболитов определяли на клеточных линиях модельных растений *A. thaliana*, *V. vinifera* и *C. cardunculus*. Клетки растений культивировали в жидких питательных средах (Таблица 7), в которые в асептических условиях вносили стерильные растворы AgNO<sub>3</sub> или Ag-НЧ в концентрации 5, 15 и 30 мг/л (в/о по серебру). После двух недель роста (25°С, 120 г в темноте) биомассу клеток отделяли от питательной среды, взвешивали, сушили теплым воздухом и проводили масс-спектрометрический анализ накопления вторичных метаболитов.

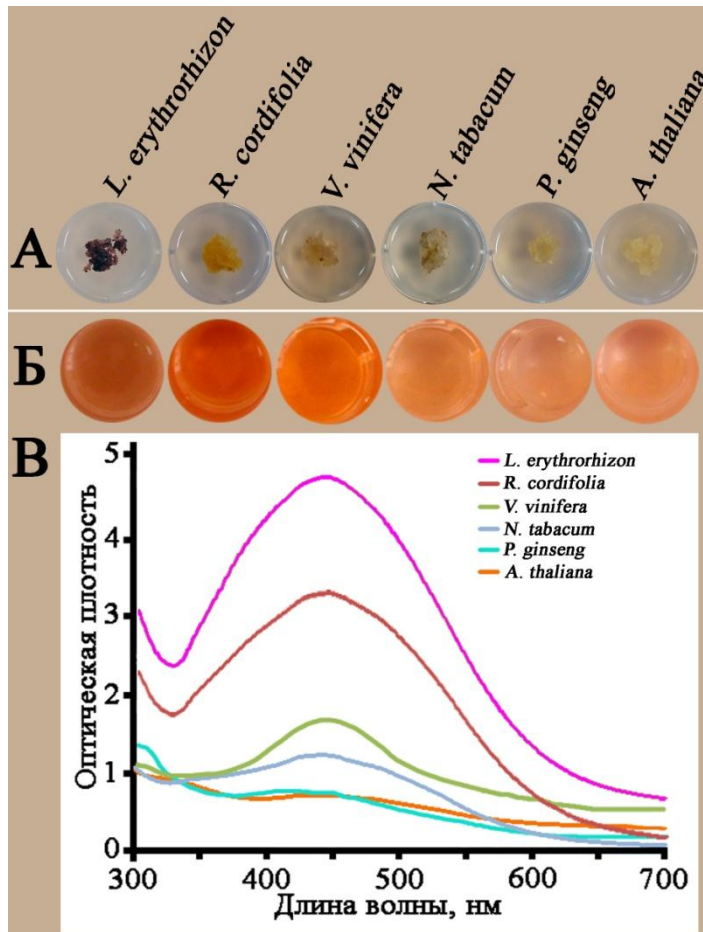
**Статистический анализ.** Результаты экспериментов обработаны при помощи программы Statistica версии 10.0 (StatSoft Inc., США). Все значения выражены как среднее значение ± стандартная ошибка. Для проверки гипотезы о различии средних двух независимых выборок использовали t-критерий Стьюдента. Гипотезу о нормальности распределения данных проверяли с применением теста Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Вилкса. Уровень статистической значимости был установлен на уровне  $P < 0,05$ .

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### 3.1. Скрининг восстановительной активности клеточных культур растений

Цель начального этапа работы состояла в проведении скрининга восстановительного потенциала клеточных культур некоторых модельных и лекарственных растений из коллекции отдела биотехнологии ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН. Для изучения возможности получения НЧ металлов с использованием экстрактов были использованы клеточные культуры растений. В работе использовали каллусные культуры табака обыкновенного *N. tabacum*, марены сердцелистной *R. cordifolia*, женьшеня настоящего *P. ginseng*, винограда культурного *V. vinifera*, воробейника краснокорневого *L. erythrorhizon* и резуховидки Таля *A. thaliana* (Рисунок 5А). Восстановительную активность оценивали по способности каллусных экстрактов инициировать формирование Ag-НЧ. На Рисунке 5Б представлен внешний вид растворов Ag-НЧ, полученных с использованием соответствующих клеточных культур. Появление окраски реакционной смеси – от светло-желтой до темно-коричневой, связано с возбуждением поверхностных плазмонных колебаний, позволяющим визуально отслеживать формирование Ag-НЧ в растворе. Измерение оптической плотности (ОП) (Рисунок 5В) растворов выявило наличие характерной для Ag-НЧ полосы поглощения в районе 440 нм, интенсивность которой варьировала от 0,69 до 4,71 в зависимости от типа культуры. В целом, все протестированные клеточные линии обладали восстановительным потенциалом, однако, по ОП среди них можно выделить три группы. Культуры женьшеня и арабидопсиса проявляли низкую активность (ОП менее 0,71). Каллусы винограда и табака формировали среднюю по активности группу с ОП в интервале от 1 до 2. Наконец, в группу с наибольшим восстановительным потенциалом вошли культуры воробейника и марены, у которых значение ОП превосходило 3 ед. Стоит отметить, что, несмотря на то, что в настоящее время восстановительный потенциал изучен для нескольких десятков растений, сведения о такой активности у клеточных культур очень ограничены. До публикации наших данных были изучены Ag-НЧ и Au-НЧ, полученные всего для семи клеточных культур: *Carica papaya* (Mude et al., 2009), *Taxus yunnanensis* (Xia, Ma and Wang, 2016), *Hyptis suaveolens* (Botcha and Prattipati, 2020), *Citrullus colocynthis* (Satyavani et al., 2011), *Sesuvium portulacastrum* (Nabikhan et al., 2010), *Linum usitatissimum* (Anjum and Abbasi, 2016), *Solanum incanum* (Lashin et al., 2021), *Michelia champaca* calli (Iyer and Panda, 2016) и *Arachis hypogaea* (Raju, Mehta and Ahmad, 2013). Полученные нами данные значительно расширяют спектр культур, перспективных для использования в процессах биологического формирования НЧ.

Поскольку наиболее выраженный восстановительный эффект наблюдался у *L. erythrorhizon*, для дальнейшего изучения формирования НЧ была выбрана именно эта культура.



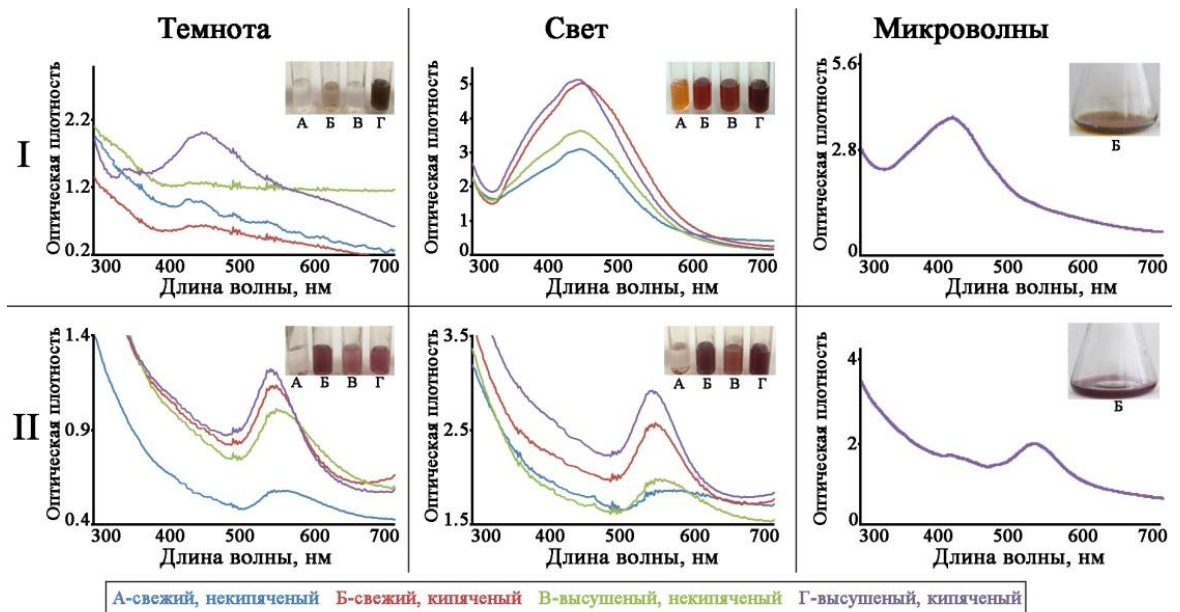
**Рисунок 5** – Скрининг восстановительной активности клеточных культур растений. (А) Внешний вид клеточных культур растений, использованных для определения восстановительной активности. (Б) Интенсивность окраски растворов Ag-НЧ, полученных с помощью клеточных культур. (В) Спектры поглощения растворов Ag-НЧ.

### 3.2. Влияние условий реакции на получение наночастиц серебра и золота

В первую очередь мы решили оценить влияние различных способов приготовления экстракта и условий реакции на восстановительную способность каллусной культуры *L. erythrorhizon*. Водные экстракты каллусной культуры *L. erythrorhizon* кипяченые или некипяченые, приготовленные из свежей или высушенной каллусной ткани, смешивали с растворами нитрата серебра или золотохлористоводородной кислоты, затем реакционные смеси инкубировали при постоянном освещении или в его отсутствии и с постоянным перемешиванием. Во время инкубации бесцветные реакционные растворы приобретали желтовато-коричневый и красновато-винный оттенок в присутствии  $\text{AgNO}_3$  и  $\text{HAuCl}_4$ , соответственно. В экстрактах без добавления предшественников или в растворах  $\text{AgNO}_3$  и

$\text{HAuCl}_4$  без добавления экстракта изменения цвета не происходило. Появление окраски связано с возбуждением поверхностных плазмонных колебаний, характерных для Ag-НЧ и Au-НЧ, соответственно (Mock et al., 2002), что позволяет визуально отслеживать образование металлических НЧ в водных растворах. Предварительная оценка образования НЧ была проведена с помощью спектрофотометрического анализа (Рисунок 6). Характерную полосу поверхностного плазмонного резонанса (ППР) восстановленных Ag-НЧ наблюдали при 443–445 нм для реакций, проводимых во всех испытанных условиях. Характерная полоса ППР восстановленных Au-НЧ варьировала в диапазоне от 538 до 567 нм в зависимости от условий эксперимента. Например, сдвиг пиков ППР в области синего света был отмечен для Au-НЧ, приготовленных из кипяченого экстракта как свежей, так и высушенной биомассы каллусов *L. erythrorhizon*. Стоит отметить, что световое освещение также вызывало подобный сдвиг в максимуме поглощения биосинтезированных нанокристаллов золота. Эти сдвиги, вероятно, возникли из-за уменьшения показателя преломления диэлектрической среды, окружающей Au-НЧ, и указывают на уменьшение средних размеров частиц (Bao and Lan, 2018). Интересно, что как температура экстракции, так и световые условия инкубации существенно влияли на эффективность реакций восстановления (Рисунок 6). Мы обнаружили, что кипяченый экстракт демонстрировал лучшую восстановительную способность по сравнению с некипяченым экстрактом во всех экспериментальных условиях. Кроме того, реакционные смеси, которые инкубировали в темноте, имели значительно менее интенсивную окраску, в отличие от тех, которые инкубировали при освещении. Этот эффект был особенно значительным в случае Ag-НЧ, поскольку их формирование в темноте было возможно только при использовании кипяченого экстракта из высушенной биомассы. Однако при постоянном освещении более важным для восстановления ионов золота было кипячение экстракта. Ранее было показано, что метод зеленого синтеза Ag-НЧ в темноте не дает характерных пиков ППР даже после продолжительного времени реакции (Bao and Lan, 2018; Verma, Hasan and Vanik, 2016). Более того, свет различных типов и спектров, такой как УФ-обработка, облучение солнечным светом и воздействие флуоресцентного света также способствовали биоинспирированному синтезу металлических НЧ (Annadhasan, Kasthuri and Rajendiran, 2015; Filip et al., 2019; Khamhaengpol and Siri, 2016). Излучение света способствовало производству серебряных, золотых и биметаллических НЧ в зависимости от плотности энергии (Bassetto et al., 2020). Возможно, что некоторые биомолекулы, например, соединения, содержащие ароматические группы, и белки (Khamhaengpol and Siri, 2016), присутствующие в экстракте каллуса *L. erythrorhizon*, подвергаются фотовозбуждению при непрерывном освещении, высвобождая свободные электроны для восстановления ионов-предшественников и приводя к образованию НЧ. Было показано, что фотоны синего света

обладают наиболее сильным фотокаталитическим действием по сравнению с другими монохроматическими источниками освещения (Bhardwaja et al., 2018). Кипячение экстракта также широко используется в биологических методах получения металлических НЧ (Verma, Hasan and Vanik, 2016). Принято считать, что эта процедура способствует обогащению экстракта биомолекулами-восстановителями, повышая способность экстракта к образованию НЧ (Bhardwaj K. et al., 2020).

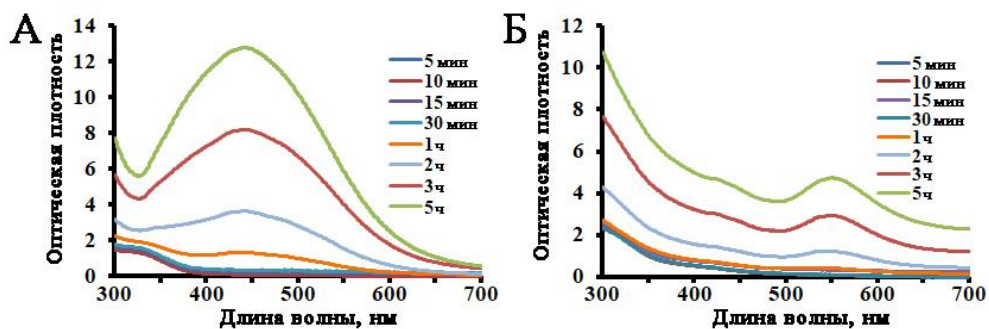


**Рисунок 6** – Спектры поглощения Ag-НЧ (I) и Au-НЧ (II), полученных с использованием каллусной культуры *L. erythrorhizon* в различных условиях. Синим цветом обозначены спектры поглощения Ag-НЧ и Au-НЧ, полученных с использованием некипяченого экстракта из свежесобранной биомассы, красным – кипяченого экстракта из свежесобранной биомассы, зеленым – некипяченого экстракта из высушенной биомассы, фиолетовым – кипяченого экстракта из высушенной биомассы.

Еще один важный фактор, который следует учитывать при биосинтезе металлических НЧ – это микроволновое облучение. Мы проверили потенциал микроволнового нагрева для интенсификации восстановления ионов серебра и золота в присутствии сухого и кипяченого экстракта *L. erythrorhizon*. Действительно, обработка микроволнами в течение 5 минут приводила к быстрому изменению цвета раствора от бесцветного до желтовато-коричневого и красного винного цвета для прекурсоров серебра и золота, соответственно (Рисунок 6). Однако итоговая эффективность такого способа биовосстановления была сопоставима с длительной инкубацией (для Au-НЧ) или даже ниже (для Ag-НЧ). Эти результаты показывают, что синтез с помощью микроволнового излучения имеет преимущество с точки

зрения времени, необходимого для получения наноструктур золота, но световое облучение является более важным физическим фактором, чем нагрев, для восстановления ионов-предшественников в случае образования Ag-НЧ. Известно, что микроволновое излучение способствует повышению эффективности синтеза НЧ как с использованием химического, так и биологического подходов. Например, микроволновая обработка повышала эффективность биосинтеза Ag-НЧ с использованием экстрактов *Epicoccum nigrum* и *Theobroma cacao* (Qian et al., 2013; Mellinas, Jiménez and Garrigós, 2019). Микроволновое облучение также значительно способствовало синтезу Ag-НЧ и Au-НЧ, опосредованного эозин-метиленовым синим агаром (Lomelí-Rosales et al., 2019). Более того, показано, что в определенных условиях микроволнового облучения достаточно для получения стабильных Ag-НЧ даже без добавления восстанавливающих агентов (Noroozi et al., 2012).

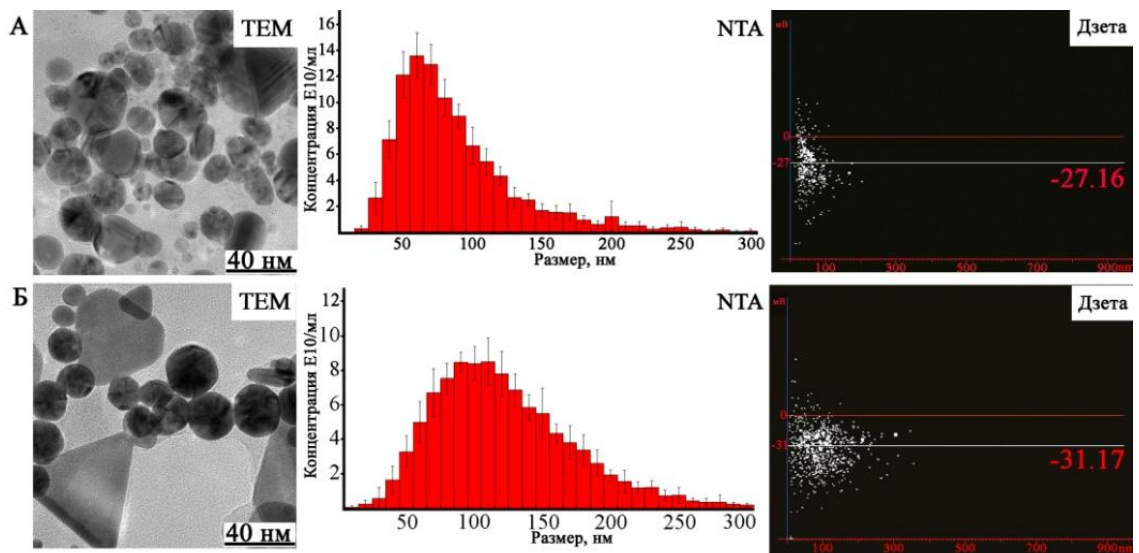
Чтобы исследовать динамику восстановления ионов металлов, кипяченый экстракт из высушенной биомассы каллусной культуры *L. erythrorhizon* смешивали с соответствующими растворами предшественников и отслеживали формирование Ag-НЧ и Au-НЧ с помощью спектрофотометрического анализа (Рисунок 7). В случае Au-НЧ цвет раствора был желтым, и он быстро менял цвет на красный в течение нескольких минут после добавления экстракта каллуса. Однако в случае Ag-НЧ требовался, по крайней мере, 1 час для появления первых признаков желто-коричневой окраски в бесцветной реакционной среде. Для завершения восстановления ионов серебра и золота потребовалось всего 5 часов, после чего значительных изменений оптической плотности уже не происходило. Существенного смещения максимумов поглощения за период инкубации также не зафиксировано. Подобная динамика изменения цвета была ранее обнаружена для Ag-НЧ, полученных с использованием экстрактов растений *Solanum xanthocarpum*, *Artemisia turcomanica*, *Gleichenia pectinata* и *Spirogyra varians* (Amin et al., 2012; Mousavi, Tafvizi and Bostanaba, 2018; Femi-Adepoju et al., 2019; Salari et al., 2016).



**Рисунок 7** – Спектры поглощения Ag-НЧ (А) и Au-НЧ (Б), полученных с использованием экстракта каллусной культуры *L. erythrorhizon*, в зависимости от времени реакции.

Форму и размер биосинтезированных Ag-НЧ и Au-НЧ изучали после инкубации с экстрактом каллуса *L. erythrorhizon* с помощью ТЕМ. Анализ Ag-НЧ показал образование преимущественно сферических частиц размером от 20 до 50 нм (Рисунок 8ТЕМ). Разница между двумя атомными слоями составила 0,16 нм. Это значение приблизительно соответствует межплоскостному расстоянию между плоскостями (003) серебра. Согласно данным ТЕМ, Au-НЧ представлены структурами треугольной, сферической и пятиугольной формы в диапазоне размеров 10–45 нм (Рисунок 8ТЕМ). Наименьший параметр решетки, рассчитанный по каждому изображению, составлял 0,23 нм в каждом случае, что соответствует межплоскостному расстоянию между плоскостями (111) золота. В целом, результаты ТЕМ показали, что биосинтезированные нами частицы по форме и размерам были подобны описанным ранее при использовании биологических способов синтеза с помощью экстрактов растений и клеточных культур (Filip et al., 2019). В частности, общая тенденция, согласно которой синтез Au-НЧ с использованием растительных экстрактов приводит к разнообразию форм и размеров, была ранее описана при биосинтезе с использованием водных экстрактов из джутовой мальвы (Ismail et al., 2018), гибискуса (Philip, 2010) и черного чая (Begum et al., 2009).

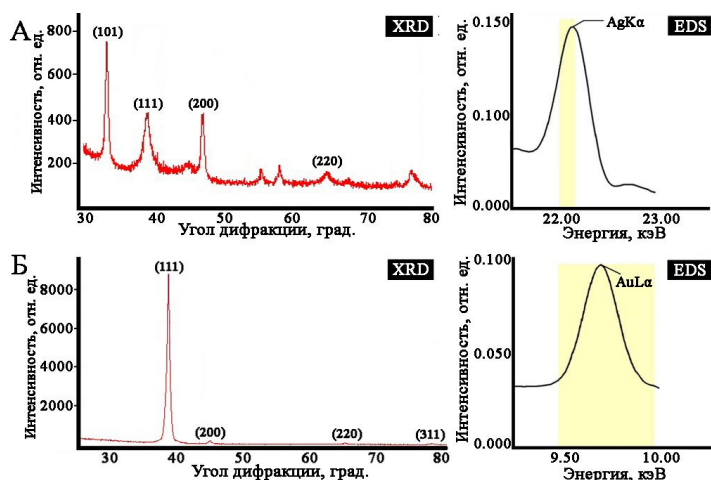
Распределение частиц по размерам было дополнительно изучено с помощью NTA (Рисунок 8NTA). Средний размер синтезированных НЧ измеренных с помощью данного подхода составил  $85 \pm 9$  нм для Ag-НЧ и  $108 \pm 12$  нм – для Au-НЧ. Примечательно, что размеры НЧ, определенные с помощью ТЕМ оказались намного меньше, чем значения, полученные с помощью NTA. Следует учитывать, что измерения NTA зависят от свойств поверхности частиц и определяют размер согласно гидродинамическому диаметру, тогда как ТЕМ может измерять фактический диаметр металлических нанокристаллов, поскольку окружающие молекулы воды недостаточно электронно-плотные, чтобы обеспечить контраст. Кроме того, методы светорассеяния, такие как NTA, не позволяют различить отдельные и агрегированные частицы, что может привести к большему расчетному диаметру, по сравнению с ТЕМ. Дзета-потенциал, с помощью которого можно оценить меру электростатического взаимодействия между частицами и который в значительной степени определяет устойчивость коллоидных систем также измеряли с помощью метода NTA. Расчётные величины дзета-потенциала Ag-НЧ и Au-НЧ составили  $-27$  мВ и  $-31$  мВ, соответственно (Рисунок 8Дзета). Таким образом, высокие значения дзета-потенциала биосинтезированных НЧ указывают на наличие сильных отталкивающих сил между частицами в коллоидном растворе, что должно предотвращать их агрегацию и, следовательно, обеспечивать высокую степень стабильности (Rajesh et al., 2018).



**Рисунок 8** – Анализ Ag-НЧ (А) и Au-НЧ (Б), полученных с использованием экстракта каллусной культуры *L. erythrorhizon*. ТЕМ – изображения Ag-НЧ и Au-НЧ, полученные с помощью трансмиссионной электронной микроскопии; NTA – распределение размеров Ag-НЧ и Au-НЧ, полученное на основе анализа траекторий движения НЧ; Дзета – измерение электрического потенциала с помощью метода NTA.

Для определения кристаллической структуры полученных НЧ, использовали XRD анализ (Рисунок 9XRD). Дифракционные пики при значениях  $2\theta$   $38,18^\circ$ ,  $44,12^\circ$  и  $64,55^\circ$  соответствуют плоскостям решетки (111), (200) и (220) гранцентрированной кубической (ГЦК) структуры Ag-НЧ. Соответствующие значения d-расстояний Ag-НЧ составляли 2,36, 2,05 и 1,44. Данная дифракционная картина соответствует практически чистому серебру. Аналогичные дифракционные пики при значениях  $2\theta$   $38,24^\circ$ ,  $44,48^\circ$ ,  $64,71^\circ$  и  $77,70^\circ$  соответствуют плоскостям брэгговского отражения (111), (200), (220) и (311) ГЦК-структуры Au-НЧ. Значения d-расстояния между линиями XRD Au-НЧ составляли 2,35, 2,04, 1,44 и 1,23, соответственно. Экспериментально установленная дифракционная картина биосинтезированных НЧ соответствует стандартам серебряных и золотых материалов № 04-0783 и № 04-0784, соответственно, из базы данных Объединенного комитета по стандартам порошковой дифракции (с англ. Joint Committee on Power Diffraction Standards, JCPDS). Средний размер Ag-НЧ и Au-НЧ, полученных в наших экспериментах, был определен на основании данных XRD с использованием формулы Шеррера, и составил 8 нм и 14 нм, соответственно. Элементный состав кристаллов был дополнительно оценен с помощью EDS, который показал, что полученные частицы состоят из атомов серебра и золота без дополнительных примесей (Рисунок 9EDS). В совокупности, полученные результаты показывают, что ионы серебра и золота действительно были восстановлены до  $\text{Ag}^0$  и  $\text{Au}^0$  компонентами экстракта каллусной культуры воробейника краснокорневого *L. erythrorhizon*.

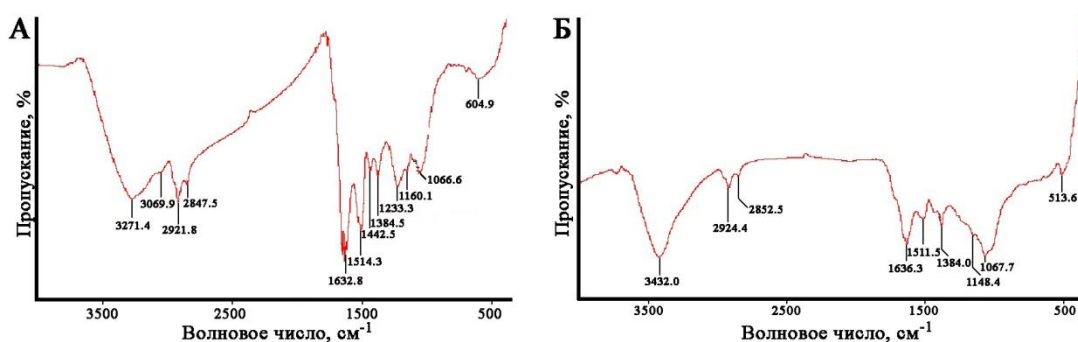
При этом основные физические характеристики биосинтезированных НЧ соответствуют данным, приведенным ранее разными авторами для частиц, полученных с применением экстрактов растений и клеточных культур (Ramakritinan et al., 2013; Nabikhan A. et al., 2010; Haroon V.H. et al., 2016).



**Рисунок 9** – Спектры, полученные в результате XRD и EDS анализов. Ag-НЧ (А) и Au-НЧ (Б), полученных с использованием экстракта каллусной культуры *L. erythrorhizon*.

Для выявления потенциальных биомолекул, участвующих в восстановлении и стабилизации металлических НЧ, опосредованных экстрактом каллуса *L. erythrorhizon* проводили анализ частиц с помощью FTIR (Рисунок 10). Спектры FTIR Ag-НЧ (Рисунок 10А) показали характерные пики при 3271, 3069, 2921, 2847, 1632, 1514, 1442, 1384, 1233, 1160, 1066 и 604  $\text{см}^{-1}$ . Au-НЧ (Рисунок 10Б) показали аналогичные пики при 3432, 2924, 2853, 1636, 1511, 1384, 1148, 1068 и 513  $\text{см}^{-1}$ . Большие участки колебания групп (O–H) и (C–H), полученные для Ag-НЧ 3271, 3069, 2921 и 2847  $\text{см}^{-1}$  и золота 3432, 2924, 2853  $\text{см}^{-1}$ , обычно связывают с полисахаридами, адсорбированными на поверхности НЧ. Эти полосы также характерны для фенольной и карбоксильной групп ароматических соединений (Tamuly et al., 2013). Кроме того, эта область также включает валентные колебания (N–H) амидных полос I и II белков (Ismail et al., 2018). В обоих типах НЧ основные полосы располагались между 1700 и 1000  $\text{см}^{-1}$ . Полосы при 1632, 1514 и 1442  $\text{см}^{-1}$  для Ag-НЧ и полосы при 1636 и 1511  $\text{см}^{-1}$  для Au-НЧ связаны с присутствием молекул, содержащих в своей структуре ароматические кольца (Stehfest K. et al., 2004; Mariappan, Sundaraganesan and Manoharan, 2012). Пик 1384  $\text{см}^{-1}$  был приписан валентным колебаниям группы (COO<sup>-</sup>) и деформационным колебаниям группы (CH<sub>3</sub>) липидов и белков (Ahn et al., 2009). Полосы поглощения в области 1148–1160  $\text{см}^{-1}$ , в основном, приписывают водородным и неводородным связям (C–O) в полисахаридах (Humberto et al., 2010). В Ag-НЧ пик 1233  $\text{см}^{-1}$

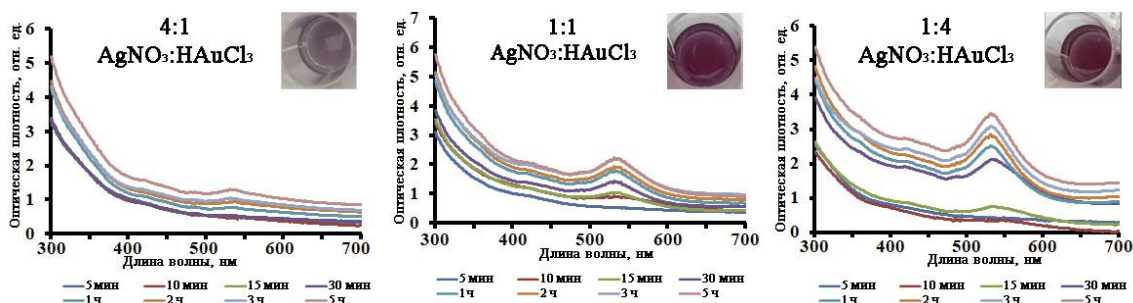
может быть связан с асимметричным колебанием группы ( $\text{PO}_2$ ) в молекулах ДНК (Wang et al., 2010). Пик  $1067\text{--}1068\text{ см}^{-1}$  обусловлен валентным колебанием связей ( $\text{C--O--C}$ ) и ( $\text{C--O}$ ) в полисахаридах (Ankamwar, 2005). Остальные полосы в области  $600\text{--}500\text{ см}^{-1}$  могут быть обусловлены сигналами связи ( $\text{C--H}$ ) различных органических молекул экстракта (Ankamwar, 2005). Таким образом, FTIR-спектры монометаллических НЧ выявили пики, указывающие на присутствие полифенольных соединений, белков и полисахаридов в экстракте клеточной культуры *L. erythrorhizon*, что свидетельствует об их участии в синтезе и стабилизации биогенных НЧ. Эти результаты согласуются с данными о биосинтезе Ag-НЧ и Au-НЧ с использованием экстрактов перца (Tamuly et al., 2013), промышленной конопли (Singh et al., 2018) и мяты (MubarakAli et al., 2011).



**Рисунок 10** – FTIR-спектры Ag-НЧ (А) и Au-НЧ (Б), полученных с использованием экстракта клеточной культуры *L. erythrorhizon*.

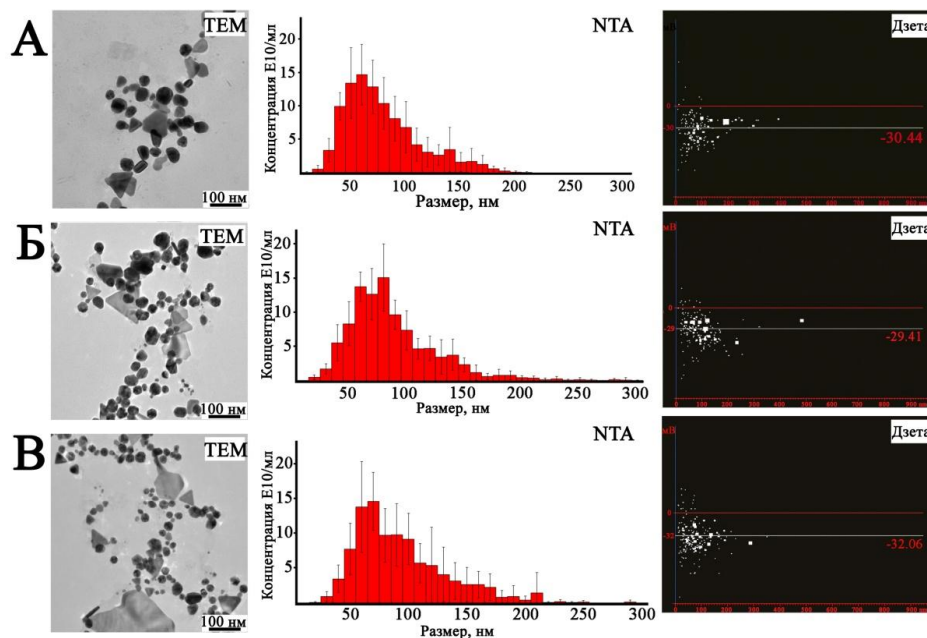
### 3.3. Получение биметаллических наночастиц

Поскольку экстракт клеточной культуры *L. erythrorhizon* вызывает образование монометаллических НЧ, мы изучили его способность синтезировать биметаллические нанокристаллы с молярным соотношением серебро/золото 4:1, 1:1 и 1:4. Биосинтез биметаллических Ag/Au-НЧ после добавления экстракта каллуса *L. erythrorhizon* может сопровождаться изменением цвета с желтого на рубиново-красный (Рисунок 11) и, кроме того, по данным спектроскопии достаточно 5 часов для завершения процесса восстановления ионов-предшественников (Рисунок 11). Было отмечено, что увеличение полосы ППР Au-НЧ ( $\lambda_{\text{max}}=545\text{ нм}$ ) было намного выше, чем у полосы ППР Ag-НЧ ( $\lambda_{\text{max}}=440\text{ нм}$ ). В связи с этим, пик поглощения Ag-НЧ не был виден даже в смеси совместного восстановления Ag/Au-(4:1)-НЧ. Тип полученных спектров поглощения, показывающий в основном один хорошо различимый пик ППР, расположенный на той же длине волны, что и для монометаллических Au-НЧ, указывает на то, что полученные биметаллические НЧ могут иметь структуру ядро-оболочка (серебряное ядро, покрытое золотой оболочкой).



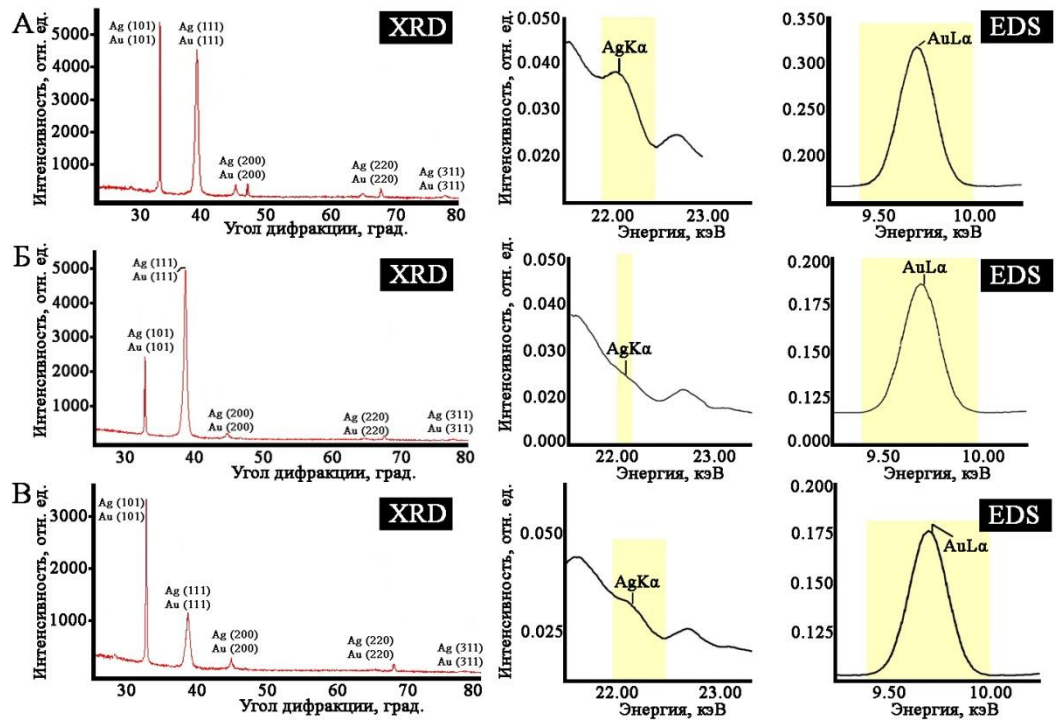
**Рисунок 11** – Спектры поглощения биметаллических Ag/Au-НЧ, полученных с использованием экстракта клеточной культуры *L. erythrorhizon* и смеси предшественников  $\text{AgNO}_3$  и  $\text{HAuCl}_3$  в соотношениях 4:1, 1:1 и 1:4, в зависимости от времени реакции.

Для определения формы и размера полученных биметаллических НЧ использовали ТЕМ-анализ (Рисунок 12ТЕМ). Биметаллические Ag/Au-(4:1)-НЧ и Ag/Au-(1:1)-НЧ имели, преимущественно, сферическую и эллиптическую форму и, в меньшей степени, треугольную, пентагональную и гексагональную, в то время как Ag/Au-(1:4)-НЧ представлены, в основном, треугольными, пятиугольными и шестиугольными структурами. Размеры биметаллических НЧ (Рисунок 12ТЕМ) находились в диапазоне от  $3,0 \pm 0,2$  до  $45,0 \pm 1,3$  нм. Разница между двумя атомными слоями составила 0,21 нм.



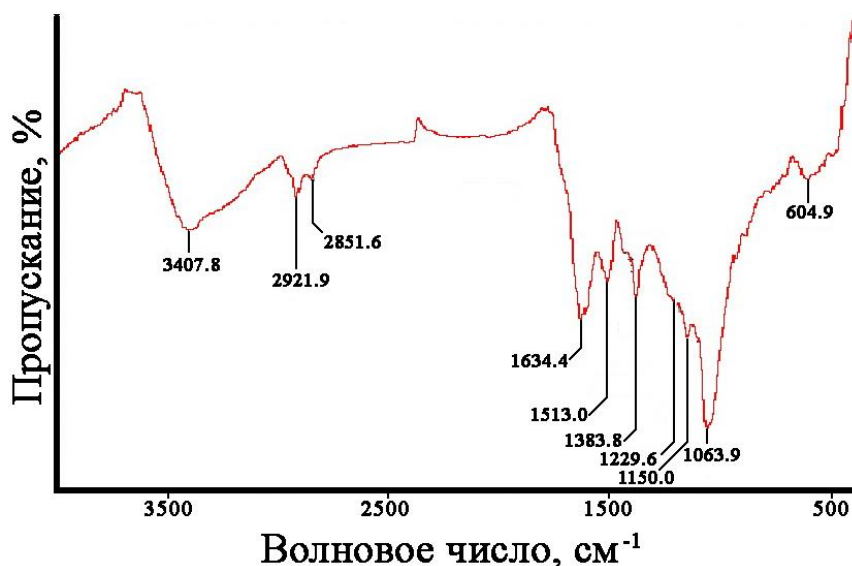
**Рисунок 12** – Анализ биметаллических Ag/Au-НЧ, полученных с использованием экстракта клеточной культуры *L. erythrorhizon*. ТЕМ – изображения биметаллических НЧ, полученные с помощью трансмиссионной электронной микроскопии; NTA – распределение размеров биметаллических НЧ, полученное на основе анализа траекторий движения НЧ; Дзета – значения электростатического потенциала биметаллических НЧ, определенным методом NTA. (А) – Ag/Au-(4:1)-НЧ, (Б) – Ag/Au-(1:1)-НЧ, (В) – Ag/Au-(1:4)-НЧ.

Распределение размеров, полученных НЧ, исследовали с помощью измерений НТА. Средние размеры биметаллических Ag/Au-НЧ в соотношении 4:1, 1:1 и 1:4 составили  $89 \pm 11$  нм,  $73 \pm 11$  нм и  $84 \pm 6$  нм, соответственно. Значение дзета-потенциала (Рисунок 12 Дзета) для Ag/Au-НЧ с соотношением 4:1, 1:1 и 1:4 составило  $-32,06$  мВ,  $-30,44$  мВ и  $-29,41$  мВ, соответственно, что указывает на высокую стабильность биметаллических коллоидов (Jacob, Mukherjee and Kapoor, 2012).



**Рисунок 13** – Спектры XRD и EDS биметаллических Ag/Au-НЧ, полученных с использованием экстракта клеточной культуры *L. erythrorhizon*. (А) – Ag/Au-(4:1)-НЧ, (Б) – Ag/Au-(1:1)-НЧ, (В) – Ag/Au-(1:4)-НЧ.

Спектр FTIR биметаллических Ag/Au-НЧ (Рисунок 14) с соотношением 1:1 показали характерные пики при 3408, 2922, 2851, 1634, 1513, 1384, 1230, 1064 и  $605 \text{ см}^{-1}$ . Следует отметить, что приведенный спектр был типичен также и для биметаллических частиц с другим соотношением металлов. Можно отметить, что спектры FTIR Ag/Au-НЧ напоминают спектры индивидуальных Ag-НЧ и Au-НЧ, полученных с использованием экстракта клеточной культуры *L. erythrorhizon* (Рисунок 10). В частности, полосы поглощения при 3407,8 и  $1229,6 \text{ см}^{-1}$  были аналогичны полосам, полученным в Ag-НЧ. Пики 1150,0 и 604,9 характерны для Au-НЧ. Другие полосы пропускания можно отнести к обоим типам металлических НЧ. Таким образом, наши результаты показывают, что фитохимические вещества культивируемых клеток воробейника, такие как углеводы и полифенолы, а также, в некоторой степени, белки участвуют в биологическом восстановлении биметаллических НЧ.



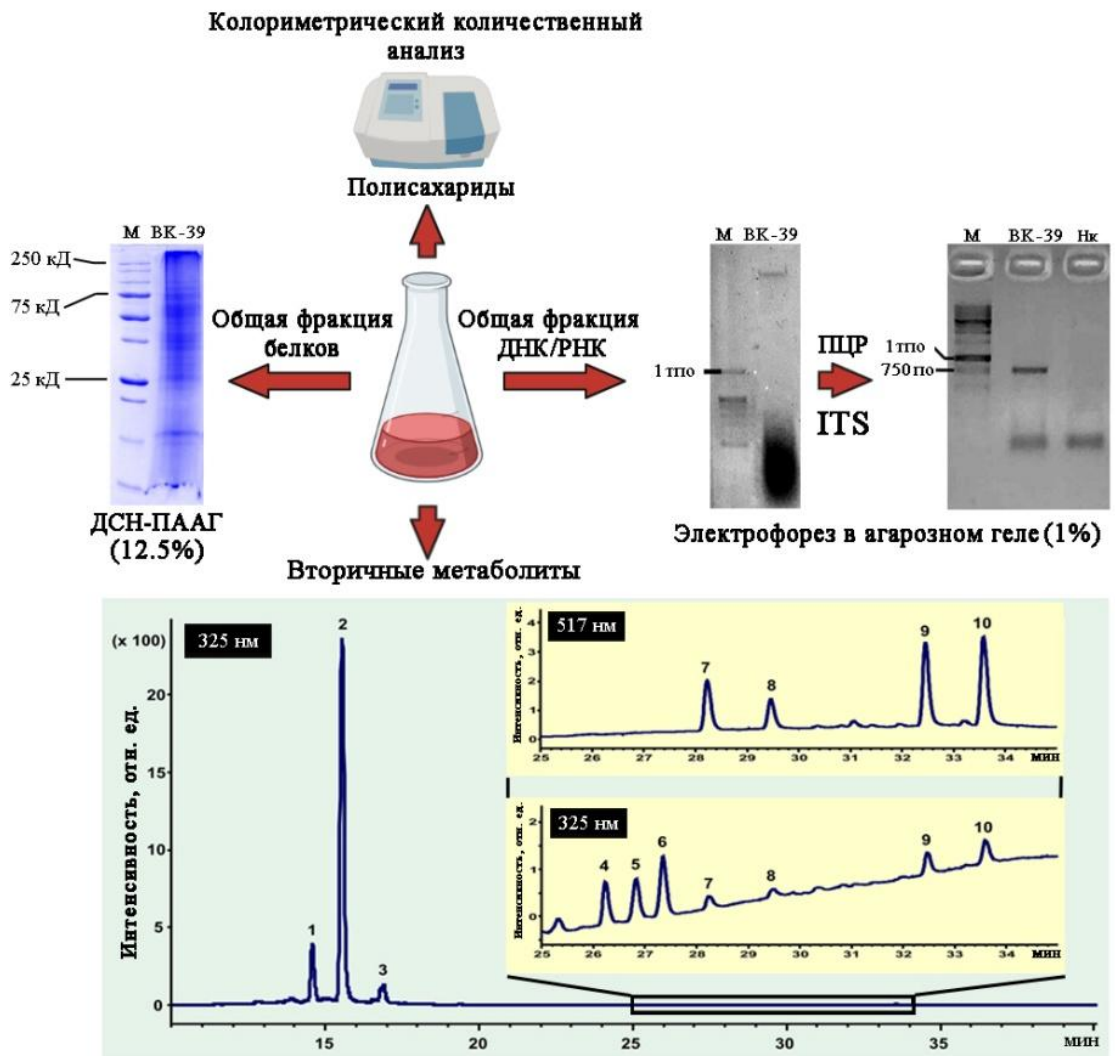
**Рисунок 14** – Спектр FTIR биметаллических Ag/Au-НЧ, полученных с использованием экстракта клеточной культуры *L. erythrorhizon*.

#### 3.4. Восстановительная активность отдельных компонентов каллусной культуры *L. erythrorhizon*

Биосинтетический потенциал различных растений или культур клеток в отношении восстановления ионов металлов сильно различаются и, очевидно, зависит от индивидуального состава экстрактов и входящих в него биомолекул, которые ответственны за восстановление ионов металлов. Многие фитохимические вещества потенциально могут действовать как восстанавливающие и стабилизирующие агенты, однако, их каталитические свойства, очевидно, отличаются. Полисахариды, белки и низкомолекулярные вторичные метаболиты обычно считаются основными восстанавливающими и стабилизирующими агентами, присутствующими в растительных экстрактах (Kojima et al., 2010; Wang et al., 2010; Khamhaengpol and Siri, 2016).

Чтобы оценить роль некоторых соединений, таких как нуклеиновые кислоты, белки, полисахариды и вторичные метаболиты, содержащихся в экстракте клеточной культуры *L. erythrorhizon*, и способных участвовать в образовании НЧ, мы проанализировали их содержание и восстановительный потенциал отдельных фракций по отношению к ионам серебра. Концентрацию нуклеиновых кислот, белков и полисахаридов определяли спектрофотометрическими методами, как описано в Главе 2 «Материалы и методы». Молекулы ДНК/РНК были наименее распространенными соединениями экстракта (Рисунки 15 и 16). Чтобы проверить нативность образца ДНК, была проведена ПЦР с праймерами, специфичными к последовательности внутреннего транскрибированного спейсера ядерной рибосомной ДНК растения. Этот эксперимент подтвердил, что экстракт *L. erythrorhizon*

содержит высокомолекулярную ДНК (Рисунок 15). Белки, представленные в экстракте *L. erythrorhizon*, анализировали с помощью электрофореза в ПААГ, а их количество определяли с помощью метода Брэдфорд. ПААГ электрофорез показал, что экстракт содержал значительное количество белков, которые были частично разрушены (Рисунок 15). Колориметрический анализ Брэдфорд подтвердил присутствие белка в относительно высокой концентрации (Рисунок 15). Однако преобладающей фракцией экстракта *L. erythrorhizon* оказалась фракция полисахаридов, количество которых на два порядка превышало содержание нуклеиновых кислот (Рисунок 16). Таким образом, наши результаты показали, что основная часть макромолекул в экстракте представлена полисахаридами и белками.



**Рисунок 15** – Анализ нуклеиновых кислот, белков, полисахаридов и вторичных метаболитов, представленных в экстракте клеточной культуры *L. erythrorhizon*.

Далее был проведен ВЭЖХ анализ для изучения фракции вторичных метаболитов, представленных в экстракте. На хроматографическом профиле (Рисунок 15) экстракта клеточной культуры *L. erythrorhizon* можно отметить присутствие трех основных пиков, которые соответствуют производным кофейной кислоты: рабдозин (1), розмариновая кислота (2) и метилросмаринат (3). Оставшиеся второстепенные пики, показанные на Рисунке 15, были отнесены к производным шиконофурана – шиконофурану D (4), шиконофурану E (5), шиконофурану C (6) и производным шиконина – гидроксизовалерилшиконину (7), ацетилшиконину (8), изобутирилшиконину (9) и изовалерилшиконину (10). Все идентифицированные метаболиты ранее были обнаружены у растений *L. erythrorhizon* (Liao et al., 2015; Yamamoto, Yazaki and Inoue, 2000; Zhao et al., 2011). Значения моноизотопных молекулярных масс были получены с помощью масс-спектрометрии высокого разрешения, и молекулярные формулы были присвоены каждому обнаруженному компоненту, который отображал погрешность массы менее 0,005 Да. Картина фрагментации ионов-прекурсоров, а также характерные максимумы поглощения, указанных пиков, хорошо согласуются с данными, опубликованными в литературе (Liao et al., 2015; Zhao et al., 2011; Pereira et al., 2013) (Таблица 11). В целом, три основных низкомолекулярных соединения (рабдозин, розмариновая кислота и метилросмаринат) составляют около 0,05% от общего содержания фитохимических веществ в экстракте *L. erythrorhizon*.

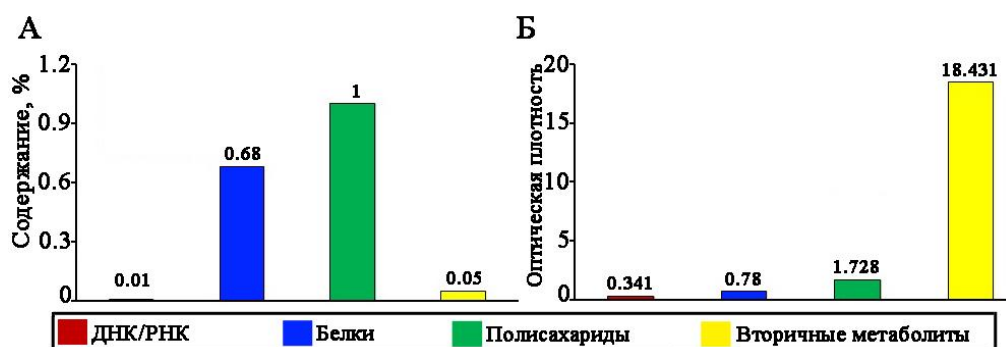
**Таблица 11.** Хроматографические и спектрометрические данные основных компонентов, идентифицированных в экстракте каллусной культуры *L. erythrorhizon*

№п/п <sup>а</sup>	$t_R$ 1 <sup>б</sup> (мин)	$t_R$ 2 <sup>б</sup> (мин)	$\lambda_{\text{макс}}$ (нм)	[M-H] <sup>-</sup> (м/з факт.)	[M-H] <sup>-</sup> (м/з теорет.)	Брутто формула	MS <sup>2</sup> фрагментация (ионы- предшественники [M-H] <sup>-</sup> ) <sup>г</sup> (% основного пика) (м/з)	Идентифицированное соединение	Ссылки
1	90,6	14,6	253, 284, 346	717,1412	717,1461	C <sub>36</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	537(5), 519(100), 475(29), 365(16), 339(10)	Рабдозин	(Lomelí- Rosales et al., 2019; Mousavi, Tafvizi and Bostanabad, 2018)
2	10,5	15,6	287, 328	359,0725	359,0772	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub>	223(6), 197(31), 179(33), 161(100), 133(5)	Розмариновая кислота <sup>д</sup>	(Lomelí- Rosales et al., 2019; Amin et al., 2012; Femi-Adepoju et al., 2019)
3	11,9	16,9	286, 326	373,0880	373,0929	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	310(26), 285(10), 197(28), 179(100), 175(18), 161(38), 135(87)	Метилросмаринат	(Femi- Adepoju et al., 2019)
4	19,9	26,2	269,	343,1517	343,1551	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> O <sub>5</sub>	255(100), 237(5)	Шиконофуран Д	(Mellinas,

			323						Jiménez and Garrigós, 2019)
5	20,5	26,8	271, 328	355,1527	355,1551	$C_{21}H_{24}O_5$	273(21), 255(100), 237(3), 227(5)	Шиконофуран Е	(Mellinas, Jiménez and Garrigós, 2019; Lomelí-Rosales et al., 2019)
6	20,9	27,3	270, 325	357,1662	357,1708	$C_{21}H_{26}O_5$	273(5), 255(100), 237(7), 227(2)	Шиконофуран С	(Mellinas, Jiménez and Garrigós, 2019)
7	21,5	28,3	272, 518	387,1421	387,1449	$C_{21}H_{24}O_7$	269(100), 251(13), 117(6)	Гидроксиизовалерилшиконин	(Mellinas, Jiménez and Garrigós, 2019; Lomelí-Rosales et al., 2019)
8	22,6	29,5	274, 516	329,1017	329,1031	$C_{18}H_{18}O_6$	269(100), 251(30), 241(13), 225(7)	Ацетилшиконин	(Mellinas, Jiménez and Garrigós,

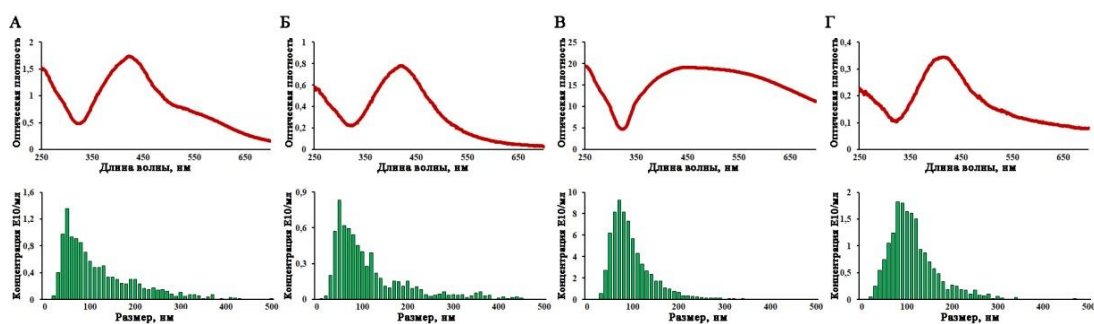
									2019; Lomelí-Rosales et al., 2019; Noroozi et al., 2012)
9	25,1	32,5	273, 517	357,1318	357,1344	C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> O <sub>6</sub>	269(100),251(16),241(3)	Изобутирилшиконин	(Mellinas, Jiménez and Garrigós, 2019; Noroozi et al., 2012)
10	26,1	33,6	273, 517	371,1472	371,1500	C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> O <sub>6</sub>	269(100),251(38), 241(10),	Изовалерилшиконин	(Mellinas, Jiménez and Garrigós, 2019; Lomelí-Rosales et al., 2019; Noroozi et al., 2012)

**Примечание.** <sup>a</sup>Пики пронумерованы, в соответствии с Рисунком 15. <sup>b</sup>Время удерживания исследуемых компонентов, полученное на масс-спектрометре LCMS-IT-TOF (Shimadzu, Япония). <sup>b</sup>Время удерживания исследуемых компонентов, полученное с помощью системы ВЭЖХ Agilent Technologies 1260 Infinity (Agilent Technologies, США). <sup>г</sup>Данные MS<sup>2</sup>, полученные в низком разрешении с использованием масс-спектрометра с ионной ловушкой (Bruker HCT ultra PTM Discovery System, Bruker Daltonik GmbH, Бремен, Германия). <sup>д</sup>Использовался эталонный стандарт



**Рисунок 16** – Относительное содержание нуклеиновых кислот, белков, полисахаридов и вторичных метаболитов в экстракте клеточной культуры *L. erythrorhizon* (А) и их восстанавливающая активность по отношению к ионам серебра (Б).

Далее мы исследовали восстановительную способность каждой из выделенных молекулярных фракций в отношении ионов серебра. Для фракций белков и нуклеиновых кислот были получены очень низкие пики поглощения (Рисунки 17Б и 17Г). В то же время фракции полисахаридов и вторичных метаболитов, были способны продуцировать большое количество Ag-НЧ (Рисунки 17А и 17 В). Средние размеры НЧ, полученных с использованием индивидуальных фракций, определенные с помощью NTA, составили  $111 \pm 15$ ,  $84 \pm 6$ ,  $89 \pm 9$  и  $93 \pm 11$  нм для нуклеиновых кислот, белков, полисахаридов и вторичных метаболитов, соответственно. Ранее было показано, что белки могут оказывать восстанавливающее и стабилизирующее действие при синтезе НЧ серебра (Yamamoto, Yazaki and Inoue, 2000), золота (Chakraborty and Parak, 2019) и биметаллов (Raju, Mendapara and Mehta, 2014). Полифенольные соединения растений также продемонстрировали, значительную активность по отношению к ионам серебра (Jigyasa, 2018) и золота (Tamuly C. et al., 2013) или к обоим (Zhang et al., 2012). Полисахариды успешно использовали для получения НЧ серебра (Wang et al., 2017), золота (Shi X. et al., 2018) и биметаллических соединений (Troupis, Niskia and Papaconstantinou, 2012). Что касается природных нуклеиновых кислот, эти молекулы обычно не рассматриваются в качестве восстановителей в биологических методах синтеза НЧ, однако, синтетические олиго- и полинуклеотиды способны восстанавливать ионы металлов и обычно используются в качестве матриц для декорирования металлических НЧ (Thompson et al., 2008; Wang et al., 2010). В целом, наши результаты показывают, что фитохимические вещества из клеточной культуры *L. erythrorhizon*, включая высокомолекулярные полисахариды, белки и, в меньшей степени, нуклеиновые кислоты, а также низкомолекулярные полифенольные соединения, представленные рабдозином, розмариновой кислотой и метилрозмаринатом проявляют синергетический восстановительный потенциал во время биологического синтеза монометаллических и биметаллических НЧ.

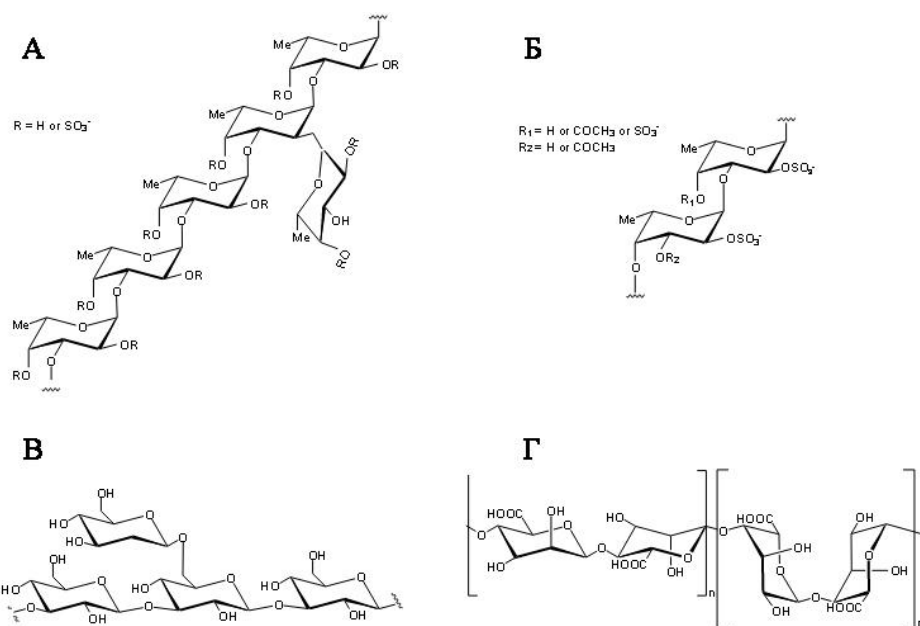


**Рисунок 17** – Спектры поглощения и распределение размеров Ag-НЧ, полученных с использованием различных фракций экстракта клеточной культуры *L. erythrorhizon*. (А) – полисахариды, (Б) – белки (В) – вторичные метаболиты, (Г) – нуклеиновые кислоты.

### 3.5. Получение наночастиц серебра с использованием полисахаридов морских водорослей

Наши результаты показали, что наиболее активными восстановителями культивируемых клеток растений являются полисахариды и вторичные метаболиты (Рисунок 18). Однако если принять во внимание относительное содержание этих компонентов в экстракте *L. erythrorhizon*, фактический вклад полисахаридов в восстановительный потенциал оказывается почти в два раза выше. Таким образом, полисахариды являются перспективными биомолекулами для биологического синтеза НЧ. Мы решили подробнее изучить особенности восстановления ионов серебра под действием индивидуальных, а не суммарных полисахаридов, чтобы выявить наличие возможной связи структура-функция в процессе реакции. Поскольку индивидуальные полисахариды воробейника не изучены, в качестве модели для этих исследований были выбраны полисахариды водорослей.

В работе использовали высокоочищенные фракции альгината (FeA) и фукоидана (FeF) выделенные из *F. evanescens*, а также ламинаран (ScL) и фукоидан (ScF) – из *S. cichorioides*. Структурные характеристики полученных полисахаридов определены методом спектроскопии ЯМР. Работа по выделению индивидуальных полисахаридов и их характеристика была проведена сотрудниками ТИБОХ ДВО РАН.



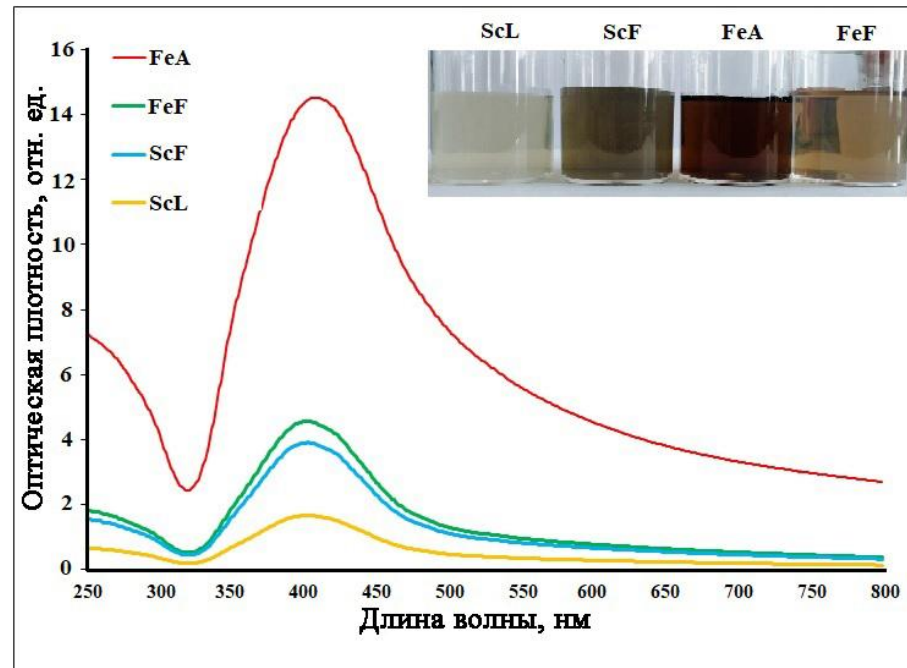
**Рисунок 18** – Основные структурные фрагменты полисахаридов: фукоидана (ScF) из *Saccharina cichorioides* (А), фукоидана (FeF) из *Fusarium evanescens* (Б), ламинарана (ScL) из *Saccharina cichorioides* (В) и альгината (FeA) из *Fusarium evanescens* (Г).

При смешивании полисахаридов с раствором предшественника, цвет реакции сразу же начинал меняться от бесцветного до коричневатого. Интенсивность коричневого цвета быстро увеличивалась в течение следующих нескольких минут, а затем оставалась стабильной в течение часа наблюдений. Появление коричневой окраски реакции указывает на формирование Ag-НЧ в растворе (Gardea-Torresdey et al., 2003). Подобным образом фукоидан, выделенный из *Turbinaria conoides*, был способен катализировать образование Ag-НЧ в течение 15 минут (Kalak, Prashob and Chandramohanakumar, 2016). Однако, при использовании фукоидана из *Fucus vesiculosus* для восстановления ионов серебра, появление характерного пика ППР наблюдали только через 2 часа реакции, а его интенсивность увеличивалась продолжительное время, и реакция завершалась только по истечении суток (Venkatesan et al., 2018). Таким образом, согласно литературным данным можно заключить, что разные полисахариды имеют разную скорость восстановления ионов серебра.

Спектры поглощения синтезированных Ag-НЧ-FeA, Ag-НЧ-FeF, Ag-НЧ-ScF и Ag-НЧ-ScL имели максимумы поглощения при 408, 402, 412 и 414 нм, соответственно (Рисунок 19). Подобные полосы ППР ранее наблюдали в различных исследованиях биологического синтеза Ag-НЧ. Например, Ag-НЧ, полученные с использованием экстракта лука (*Allium cepa*) имели максимальную полосу ППР при 413 нм (Hassabo et al., 2015). Аналогичным образом, порошок целлюлозы, микрокристаллическая целлюлоза, карбоксиметилцеллюлоза и хитозан были

успешно использованы для получения наносеребра с пиками поглощения при 407, 402, 403 и 405 нм, соответственно (Hassabo et al., 2015).

Следует отметить, что при равных условиях реакции оптическая плотность Ag-НЧ-FeA была в 3,18, 3,72 и 8,75 раза выше, по сравнению с Ag-НЧ-FeF, Ag-НЧ-ScF и Ag-НЧ-ScL, соответственно. В то же время восстановительные свойства фукоиданов *F. evanescenes* и *S. cichorioides* были практически одинаковыми. Они превосходили восстановительную силу ламинарана из *S. cichorioides* в 2,74 и 2,35 раза, соответственно.

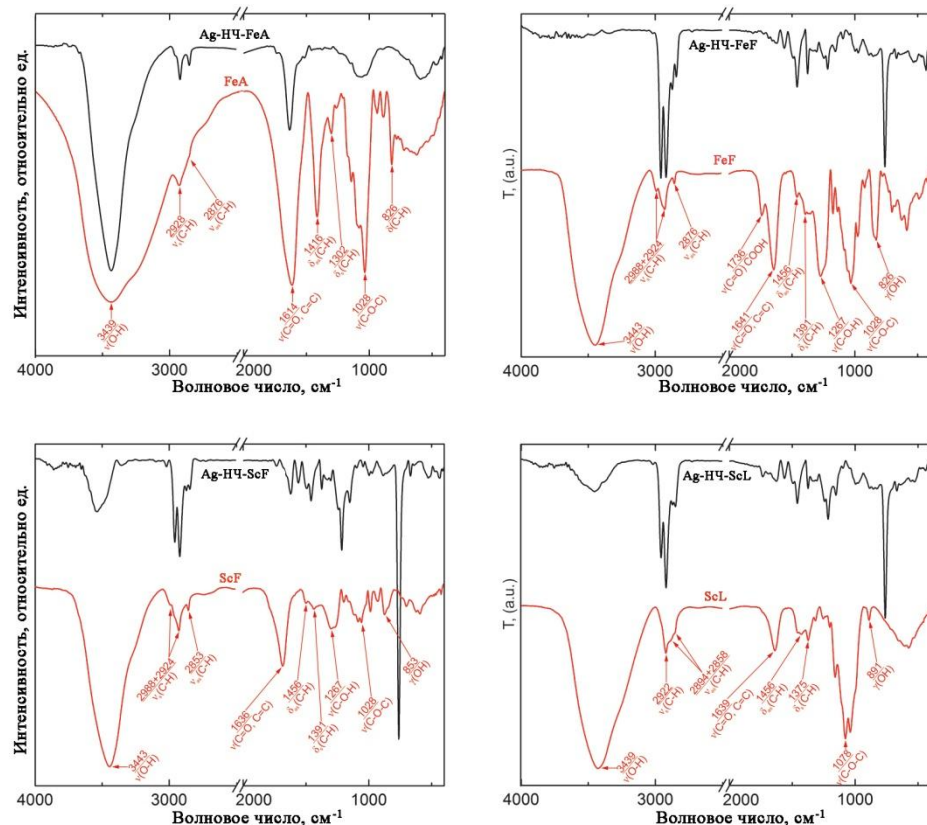


**Рисунок 19** – Спектры поглощения Ag-НЧ, полученных с использованием альгината (FeA) и фукоидана (FeF) из *F. evanescenes*, фукоидана (ScF) и ламинарана (ScL) из *S. cicharioides*. Изображение на вставке представляет внешний вид соответствующих коллоидных растворов Ag-НЧ. Желтой линией показан коллоидный раствор Ag-НЧ, полученных с использованием полисахаридов ScL, голубой – ScF, зеленой – FeF, красной – FeA.

Таким образом, наши данные свидетельствуют о том, что фукоидан и ламинаран обладают меньшим восстановительным потенциалом, чем альгинат. В целом, на основании интенсивности полос ППР можно сделать вывод, что восстановительные свойства полисахаридов увеличиваются в следующем порядке: ScL, ScF, FeF и FeA. Низкую восстановительную активность ламинарана можно объяснить тем, что он является низкомолекулярным и незаряженным полисахаридом. В свою очередь, фукоиданы представлены сульфатированными фукозосодержащими гетерополимерами средних размеров, в то время как альгинаты относятся к высокомолекулярным карбоксилированным

гетерополимерам. Вследствие чего можно сделать вывод, что молекулярная масса и структурные характеристики влияют на восстановительные свойства полисахаридов.

**Характеристика наночастиц серебра, полученных с помощью полисахаридов.** Для подтверждения участия полисахаридов в биосинтезе Ag-НЧ нами был проведен FTIR-анализ. На Рисунке 20 показаны спектры FTIR, полученные для всех исследованных Ag-НЧ, а также спектры исходных полисахаридов. Полисахариды FeA, FeF, ScF и ScL показали несколько характерных пиков (Таблица 12): пики при 3439, 3443, 3443, 3429  $\text{см}^{-1}$  обусловлены валентными колебаниями (O–H) и (N–H) групп, соответственно; симметричные и асимметричные (C–H) валентные колебания соответствуют 2922–2928 и 2853–2876  $\text{см}^{-1}$ , соответственно; группы (C=O) и (C=C) колебались в области от 1614 до 1641  $\text{см}^{-1}$ ; колебания метильной и метиленовой групп видны при 1416–1456 и 1302–1391  $\text{см}^{-1}$ , соответственно; пики в диапазоне 1028–1040  $\text{см}^{-1}$  можно отнести к валентному колебанию связи (C–O–C); пики при 826–891  $\text{см}^{-1}$  обусловлены деформационными колебаниями (CH<sub>2</sub>). Волновое число структурных деформационных вибраций варьирует в районе 700–500  $\text{см}^{-1}$ .



**Рисунок 20** – Спектры FTIR Ag-НЧ и исходных полисахаридов: Ag-НЧ-FeA и FeA, Ag-НЧ-FeF и FeF, Ag-НЧ-ScF и ScF, Ag-НЧ-ScL и ScL. Черным цветом представлены спектры Ag-НЧ, полученные с использованием полисахаридов, красным – спектры нативных полисахаридов.

**Таблица 12.** Характеристические частоты различных функциональных групп FTIR-спектров полисахаридов и их комплексов с Ag-НЧ

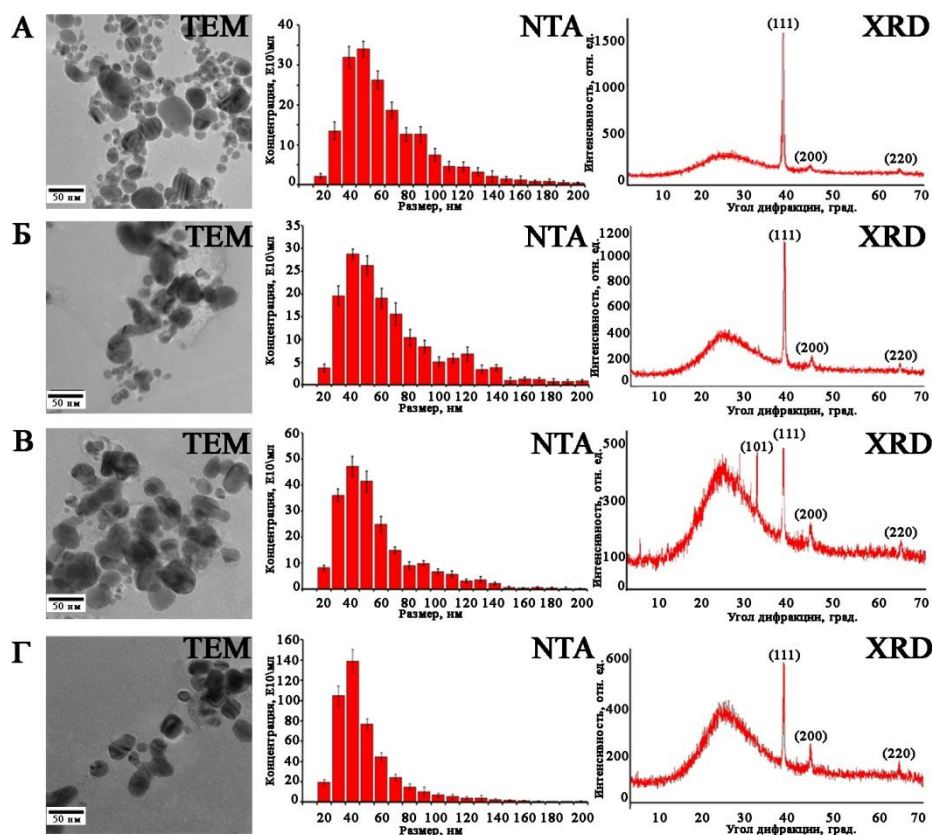
Образцы	$\nu(\text{OH}, \text{NH})$	$\nu_s(\text{CH})$	$\nu_{as}(\text{CH})$	$\nu(\text{C=O}, \text{C=C})$	$\delta_{as}(\text{CH})$	$\delta_s(\text{CH})$	$\nu(\text{C-O-C})$	$\delta(\text{CH})$
Ag-НЧ-FeA	3437	2920	2853	1636	1460	1377	1063	-
FeA	3439	2928	2876	1614	1416	1302	1028	826
Ag-НЧ-FeF	3440	2918	2841	1619	1460	1377	1006	-
FeF	3443	2924	2853	1641	1456	1391	1028	826
Ag-НЧ-ScF	3537	2920	2841	1620	1460	1377	1006	-
ScF	3443	2924	2853	1636	1456	1391	1028	826
Ag-НЧ-ScL	3452	2920	2851	1636	1460	1377	995	887
ScL	3429	2922	2858	1639	1456	1375	1040	891

Таким образом, наши данные свидетельствуют о том, что полосы FTIR связаны с колебаниями функциональных групп полисахаридов (Socrates, 2004). Полосы, характеризующие исходные полисахариды, также наблюдались в спектрах, синтезированных Ag-НЧ (Рисунок 20, Таблица 12). Это может означать, что полисахариды выступают в качестве как биовосстановителей, так и стабилизаторов растущих кристаллов серебра. Аналогичные FTIR-спектры НЧ, катализируемых полисахаридами, были получены для экстракта зеленых водорослей из *Botryococcus braunii* (Arya et al., 2018) и для полисахаридов, выделенных из экстракта кактуса (Onditi et al., 2019).

На ТЕМ-микротографиях (Рисунок 21ТЕМ) Ag-НЧ-FeA, Ag-НЧ-FeF, Ag-НЧ-ScF, Ag-НЧ-ScL, можно наблюдать преобладание частиц сферической формы со средним размером  $57 \pm 9$ ,  $64 \pm 6$ ,  $53 \pm 4$ ,  $45 \pm 2$  нм, соответственно. Этот результат хорошо согласуется с данными, полученными с помощью NTA-анализа распределения размеров частиц (Рисунок 21NTA). Дзета-потенциал для всех Ag-НЧ находился в диапазоне от  $-27$  до  $-30$  мВ (Рисунок 22). Подобные сферические Ag-НЧ размером 50 нм и сильно отрицательным значением дзета-потенциалом до  $-36$  мВ ранее были получены при использовании коммерческих препаратов хитозана и фукоидана (Syu et al., 2014).

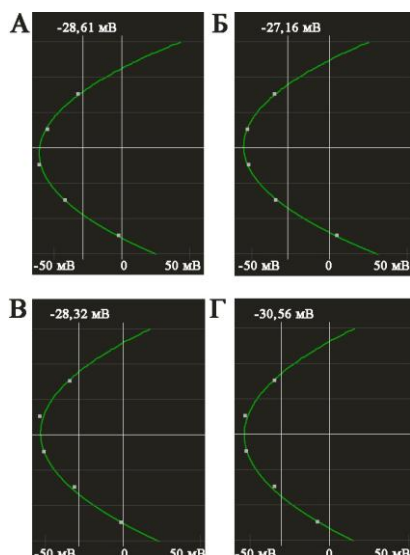
На Рисунке 21 также приведены спектры XRD полученных НЧ. Пики Ag-НЧ-FeA, Ag-НЧ-FeF, Ag-НЧ-ScL во всем спектре значений  $2\theta$  были отнесены к (111), (200), (220) плоскостям брэгговского отражения ГЦК металлической структуры серебра (Mude et al., 2009). Ag-НЧ-ScF имеют дополнительное значение  $2\theta$ , приписываемое к плоскости (101). Эти результаты согласуются с данными по биосинтезу Ag-НЧ с использованием коньякового глюкоманнана, каррагинана, инулина (Zhang et al., 2018) и сульфатированных полисахаридов из *Porphyra vietnamensis* (Venkatpurwar and Pokharkar, 2011). Средний размер кристаллов Ag-НЧ-FeA, Ag-НЧ-FeF, Ag-НЧ-ScF, Ag-НЧ-ScL был рассчитан с использованием формулы Шеррера и составил 18, 24, 37, 29 нм, соответственно. Значительно меньшие размеры Ag-НЧ,

рассчитанные с помощью XRD по сравнению с NTA или TEM, могут быть связаны с неидеальной сферической формой частиц, их поликристаллической структурой, примесями или вариацией гидродинамического диаметра (Paulkumar et al., 2014).



**Рисунок 21** – Ag-НЧ, полученные с использованием альгината из *F. evanescens* (А), фукоидана из *F. evanescens* (В), фукоидана из *S. cichorioides* (С), ламинарана из *S. cichorioides*, (D). TEM – изображения НЧ, полученные с помощью трансмиссионной электронной микроскопии; NTA – распределение размеров НЧ, полученное на основе анализа траекторий движения НЧ; XRD – рентгеновские дифракционные спектры Ag-НЧ.

Таким образом, мы показали, что очищенные растительные полисахариды действительно могут успешно применяться для получения НЧ металлов. Кроме полисахаридов значительный вклад в эффективность синтеза НЧ вносят вторичные метаболиты. Поскольку вторичный метаболизм растений может быть модифицирован с помощью методов биотехнологии, на следующем этапе работы мы изучили влияние генетической трансформации на восстановительный потенциал клеток.

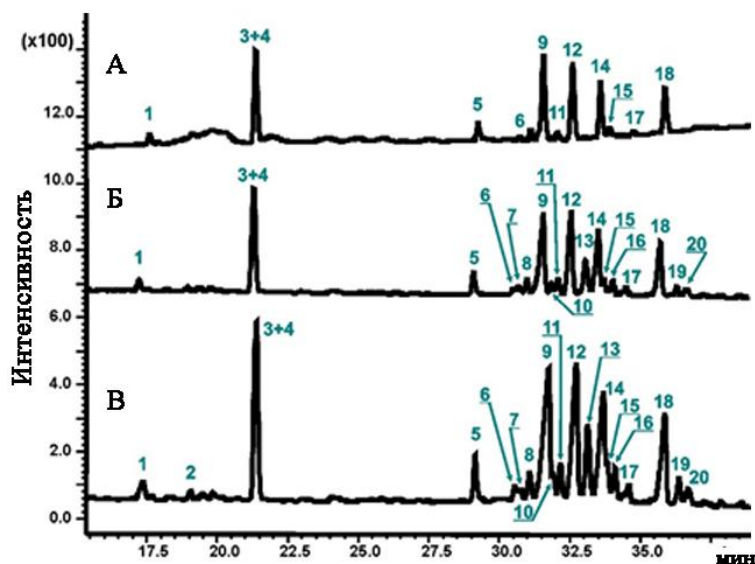


**Рисунок 22** – Кривая электрофоретической подвижности (среднее значение кривой представляет собой дзета-потенциал) Ag-НЧ, полученных с использованием (А) альгината и (Б) фукоидана из *F. evanescens*, (В) фукоидана и (Г) ламинарана из *S. cichorioides*.

### 3.6. Получение наночастиц серебра с использованием клеточных культур *P. ginseng*

Известно, что культуры клеток лекарственных растений активно применяются в качестве биотехнологического источника ценных биологически активных соединений низкомолекулярной природы (Mellinas, Jiménez and Garrigós, 2019). В особенности широкое распространение в биотехнологии получили т.н. называемые трансформированные (“бородатые”) корни, для которых характерна высокая метаболическая активность, которой при этом сопутствуют интенсивный рост, генетическая стабильность и неприхотливость к условиям культивирования (Shakeran et al., 2015). Основными генетическими детерминантами бородатых корней, определяющими данные свойства, выступают онкогены *rol*, в частности, *rolC* (Spena et al., 1987). Мы решили определить, будет ли оказывать влияние генная модификация вторичного метаболизма на восстановительные свойства трансгенных клеточных культур.

В качестве модели для проверки нашего предположения, мы использовали клеточные культуры лекарственного растения женьшеня настоящего *P. ginseng*, поскольку для этого растения были доступны как нетрансформированные (контрольные) каллусы, так и *rolC*-трансгенные каллусы и бородатые корни. Исследования проводили на примере восстановления ионов серебра.



**Рисунок 23** – Хроматографические профили экстрактов *P. ginseng*, записанные при 203 нм. (А) 1с, (Б) *rolC*-трансформированный каллус, (В) *rolC*-трансформированная культура бородатых корней. Номера пиков соответствуют номерам соединений в Таблице 13.

Как и ранее, при инкубации реакционных смесей, содержащих экстракты клеточных культур женьшеня и раствор предшественника, наблюдали, динамическое изменение цвета различной интенсивности (Рисунок 24). В контрольных образцах, содержащих только нитрат серебра без экстракта, изменения цвета не происходило. Следует отметить, что интенсивность коричневой окраски была выше в реакциях с экстрактами культур трансгенных клеток, чем с экстрактом клеточной линии 1с (Рисунок 24). По интенсивности пиков ППР восстановительная способность культуры бородатых корней оказалась в 2,8 раза выше, чем у экстрактов из 1с и *rolC*-калусов. Мы предполагаем, что наблюдаемый эффект связан с повышенной способностью бородатых корней различных видов растений к накоплению вторичных метаболитов (Kobylińska et al., 2020). В частности, экспрессия гена *rolC* в клетках женьшеня привела к аналогичным изменениям в накоплении определенных гинзенозидов (Таблица 13). Их общее содержание в *rolC*-трансгенных каллусах и бородатых корнях было в 1,5 и 3,1 раза выше, чем в контрольной линии, соответственно. В соответствии с этим, культура бородатых корней *P. ginseng* имела более высокую восстанавливающую активность.

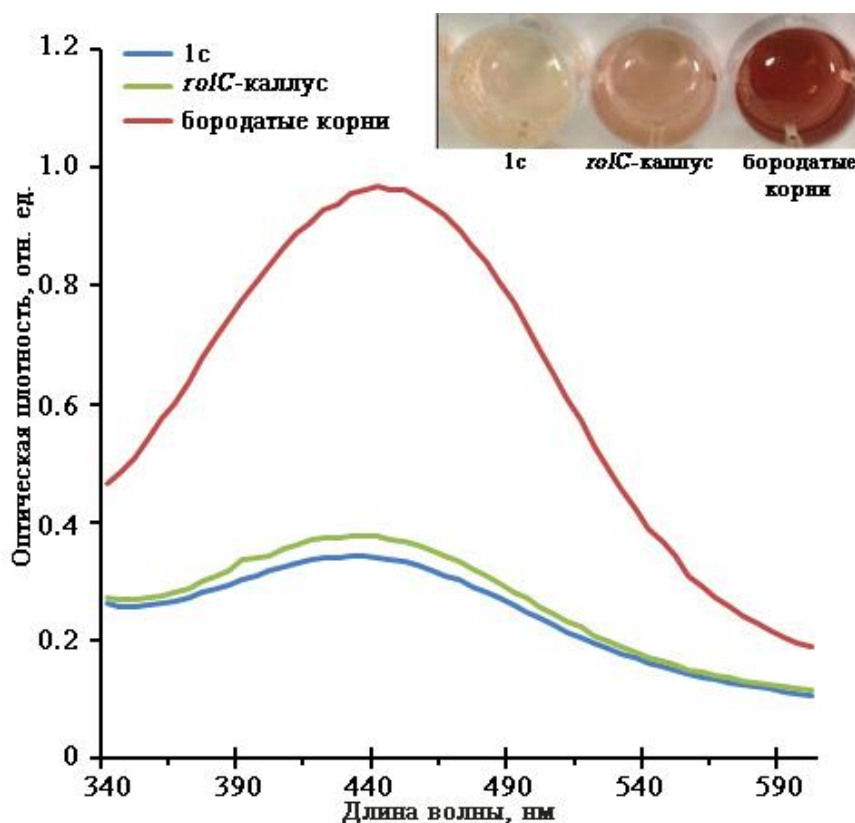
Таблица 13. Содержание гинзенозидов в клеточных линиях *P. ginseng*

№ <sup>†</sup>	Аббревиатура	1с	rolC-кallус	Бородатые корни
1	G-Re4 / iso	0.30 ± 0.01	0.39 ± 0.02	0.75 ± 0.06*
2	G-Rh20 / iso	н.о.	н.о.	0.29 ± 0.01
3, 4	G-Rg1 + G-Re	3.07 ± 0.19	3.88 ± 0.23	7.09 ± 0.80*
5	G-Rf	0.75 ± 0.04	0.80 ± 0.01	1.64 ± 0.21*
6	a-G-Rg1	0.37 ± 0.02	0.19 ± 0.02*	0.46 ± 0.04
7	m-G-Re	н.о.	0.32 ± 0.01	0.39 ± 0.02
8	G-Rb1	н.о.	0.45 ± 0.03	1.00 ± 0.10
9	G-Rg2	3.15 ± 0.21	3.83 ± 0.19	7.81 ± 0.71*
10	m-G-Rb1	н.о.	0.23 ± 0.01	0.82 ± 0.12
11	G-Rc	0.30 ± 0.02	0.41 ± 0.03*	1.13 ± 0.15*
12	m-G-Rb1 iso	2.85 ± 0.18	3.55 ± 0.14*	7.00 ± 0.39*
13	G-Ro	н.о.	1.51 ± 0.12	2.89 ± 0.16
14	G-Rb2	1.85 ± 0.11	2.77 ± 0.15*	5.51 ± 0.29*
15	m-G-Rc	0.24 ± 0.01	0.48 ± 0.06*	0.78 ± 0.09*
16	2m-G-Rb1 iso	н.о.	0.52 ± 0.03	0.83 ± 0.11
17	Chik IV / iso	0.14 ± 0.01	0.18 ± 0.02	0.38 ± 0.02*
18	G-Rd	1.60 ± 0.07	2.18 ± 0.21*	4.26 ± 0.48*
19	a-G-Rd	н.о.	0.36 ± 0.02	0.92 ± 0.12
20	Гур XVII / iso	н.о.	0.32 ± 0.02	0.75 ± 0.08
	<b>Общая сумма</b>	<b>14.74 ± 0.98</b>	<b>22.36 ± 1.39*</b>	<b>44.71 ± 2.80*</b>
	Сумма PPT	7.71 ± 0.52	9.41 ± 0.62	18.44 ± 1.23*
	Сумма PPD	6.90 ± 0.36	11.26 ± 0.43*	23.00 ± 1.52*
	Сумма Ole	0.14 ± 0.01	1.69 ± 0.05*	3.27 ± 0.27*
	PPT/PPD индекс	1.12 ± 0.07	0.84 ± 0.05	0.80 ± 0.06

**Примечание.** Данные (среднее значение ± стандартная ошибка) представляют собой измерения трех независимых экспериментов, \*  $P < 0,05$ . PPD – производные протопанаксадиола; PPT – производные протопанаксатриола; Ole – производные олеаноловой кислоты, н.о., не обнаружены. † Цифры соответствуют пикам на хроматографических профилях (Рисунок 23).

Стоит заметить, что способность самих растений *P. ginseng* к восстановлению ионов металлов была продемонстрирована ранее, поскольку в нескольких публикациях было показано использование экстрактов из свежих листьев (Singh, Kim and Yang, 2016), корней (Singh, 2016) и ягод женьшеня (Seo et al., 2017) для синтеза Au-НЧ и Ag-НЧ. Однако ресурсы дикорастущих растений женьшеня очень ограничены, а выращивание этого многолетнего растения часто требует много времени и усилий. Таким образом, бородатые корни могут обеспечить альтернативный способ производства восстанавливающих веществ, участвующих в биосинтезе НЧ. В этом отношении высокий уровень восстанавливающей активности для зеленого синтеза металлических НЧ ранее был продемонстрирован с использованием бородатых корней томатов и двух видов рода *Artemisia* (Kobylnska et al., 2020; Fatima et al., 2020; Ghasemi, Hosseini and Nayeri, 2015).

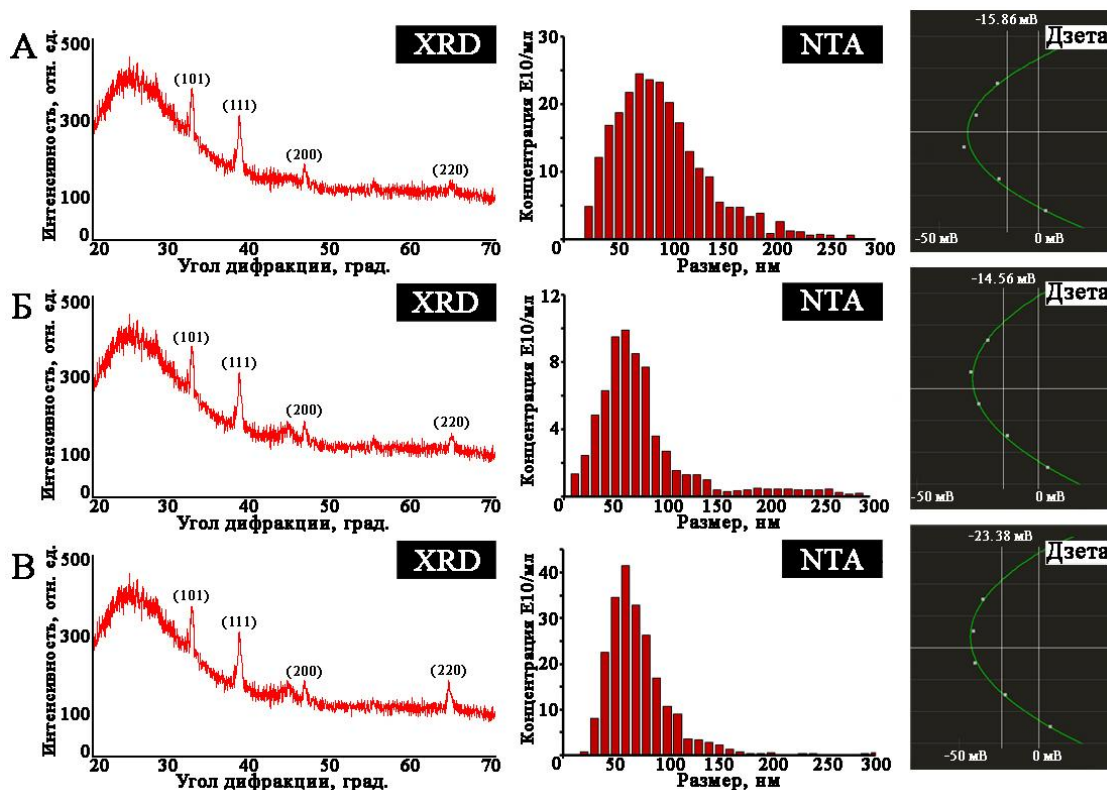
**Характеристика наночастиц серебра, полученных с использованием клеточных культур *P. ginseng*.** Наблюдаемые спектры поглощения Ag-НЧ, полученных с использованием 1с, *rolC*-экспрессирующих каллусов и бородатых корней женьшеня в УФ и видимой области имеют характерные пики при 430, 435 и 440 нм, соответственно (Рисунок 24). Максимальные значения поглощения ППР были достигнуты после 24 часов инкубации. Примечательно, что формы полос ППР Ag-НЧ женьшеня были широкими, в диапазоне от 350 до 500 нм, с хвостом поглощения на более длинных волнах. Такой характер спектра может быть связан с широким распределением биосинтезированных частиц по размеру и форме (Ferdous and Nemmar, 2020).



**Рисунок 24** – Спектры поглощения Ag-НЧ, полученных с использованием экстрактов из клеточных линий 1с, *rolC*-каллусов и бородатых корней *P. ginseng*.

Кристаллическая структура Ag-НЧ была подтверждена методом XRD (Рисунок 25XRD). Полученные дифракционные пики Ag-НЧ, синтезированных, с помощью каллуса 1с, наблюдали в диапазоне  $2\theta=32,24^\circ$ ,  $38,15^\circ$ ,  $46,28^\circ$  и  $64,64^\circ$ , пики Ag-НЧ, полученных с использованием экстракта *rolC*-каллуса – в диапазоне  $2\theta=32,20^\circ$ ,  $38,06^\circ$ ,  $46,24^\circ$  и  $64,60^\circ$ , а пики Ag-НЧ, биосинтезированных с помощью бородатых корней, находились в диапазоне  $2\theta=32,17^\circ$ ,  $38,13^\circ$ ,  $46,26^\circ$  и  $64,46^\circ$ . Эти пики совпадают с плоскостями отражения Брэгга (101), (111), (200) и (220) ГЦК структуры металлического серебра. Результаты XRD показали, что синтезированные

частицы были похожи на другие биологически-синтезированные Ag-НЧ, о которых сообщалось ранее (Jigyasa, 2018; Ibrahim et al., 2020).

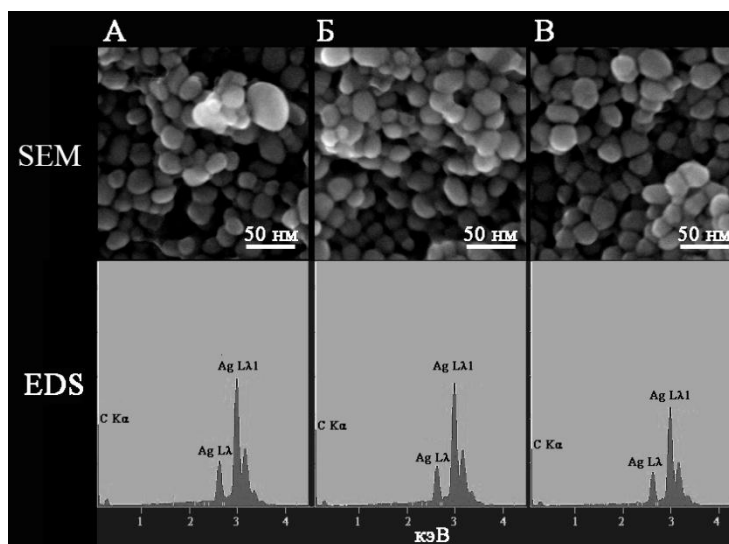


**Рисунок 25** – Ag-НЧ, полученные с использованием экстрактов клеточных линий *P. ginseng* (А) 1с, (Б) *rolC*-каллусов и (В) бородачатых корней. XRD – рентренокструктурный анализ; NTA – распределение размеров НЧ, полученное на основе анализа траекторий движения НЧ; Дзета – кривая электрофоретической подвижности НЧ.

Распределение размеров НЧ, а также их концентрацию в образцах оценивали с помощью метода NTA (Рисунок 25NTA). Средний размер Ag-НЧ, продуцируемых экстрактами 1с, *rolC*-каллусов и бородачатых корней, составлял  $89 \pm 8$ ,  $74 \pm 6$  и  $52 \pm 6$  нм, соответственно, а их концентрация была равна  $2,38 \times 10^8$ ,  $2,79 \times 10^8$  и  $4,48 \times 10^8$  частиц/мл, соответственно. Таким образом, концентрация Ag-НЧ в полученных коллоидных растворах, определенная с помощью NTA, коррелировала со значениями оптической плотности соответствующих полос ППР (Рисунок 24). Стабильность коллоидных растворов НЧ женьшеня исследовали с помощью измерения дзета-потенциала. Было обнаружено, что значение дзета-потенциала составляло – 15,86 мВ, –14,56 мВ и –23,38 мВ для Ag-НЧ, синтезированных с использованием 1с, *rolC*-каллусов и бородачатых корней, соответственно (Рисунок 25Дзета). Электростатическое отталкивание Ag-НЧ, продуцируемых экстрактом бородачатых корней, увеличивалось в среднем в 1,5 раза по сравнению с другими протестированными НЧ. Это указывает на хорошую

физическую стабильность коллоидного раствора и его способность противостоять агрегации лучше, чем Ag-НЧ, приготовленные с экстрактами линий 1с и *rolC*-кallусов.

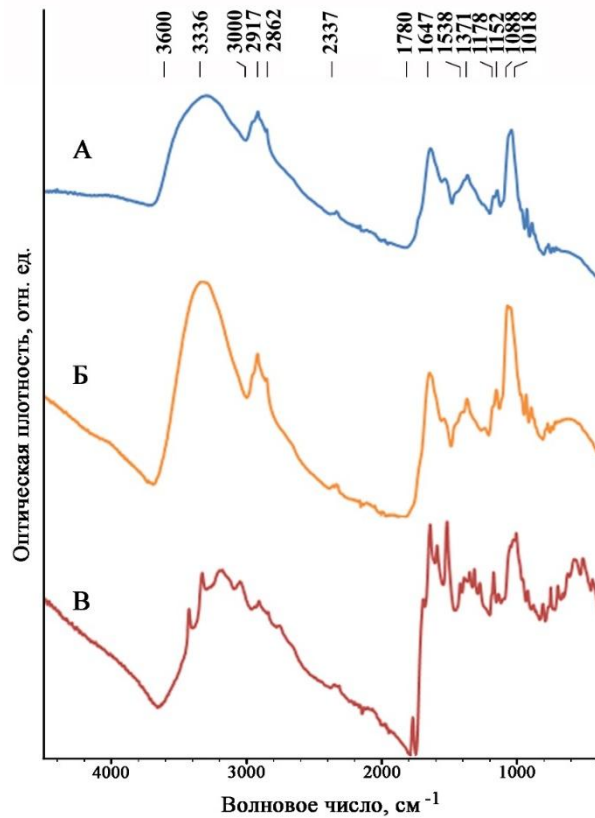
Морфологию НЧ определяли с помощью SEM. Анализ SEM-изображений показал, высокую плотность всех биосинтезированных Ag-НЧ (Рисунок 26SEM). Можно отметить, что частицы имели преимущественно сферическую форму и были представлены достаточно однородными образованиями со средним диаметром 50–89 нм, который уменьшался в ряду: 1с, *rolC*-кallусы и бородатые корни. Этот результат согласуется с соответствующими распределениями размеров частиц, полученными с помощью метода NTA (Рисунок 25NTA). Присутствие металлического серебра в биосинтезированных Ag-НЧ было подтверждено при помощи EDS-анализа (Рисунок 26EDS).



**Рисунок 26** – Микрофотографии SEM и спектры EDS Ag-НЧ, полученных с использованием экстрактов клеточных линий *P. ginseng* (А) 1с, (Б) *rolC*-кallусов и (В) бородатых корней.

Для идентификации биомолекул женьшеня, участвующих в восстановлении и стабилизации ионов серебра, проводили исследование частиц с помощью FTIR анализа (Рисунок 27). Полосы в области  $3800\text{--}3300\text{ см}^{-1}$  соответствуют вибрации связей (O–H), характерных для полисахаридов и гидроксильных групп фенольных соединений. В частности, широкая полоса при  $3336\text{ см}^{-1}$  соответствует гидроксильной группе гинзенозидов (Gopinath and Velusamy, 2013; Salari et al., 2016). Полосы  $2917$  и  $2862\text{ см}^{-1}$  могут быть отнесены к валентным колебаниям связи (C–H) гинзенозидов, а также к колебаниям метильной и метиленовой групп в аминокислотах белков или фосфолипидов (Yamanaka M. et al., 2005). Полоса, наблюдаемая при  $2337\text{ см}^{-1}$ , свидетельствует о наличии группы первичного амина ( $\text{--NH}_2$ ) (Gopinath and Velusamy, 2013). Пик при  $1780\text{ см}^{-1}$ , который был обнаружен только в НЧ, синтезированных с использованием экстракта бородатых корней, может быть отнесен к абсорбции

сложноэфирного карбонила (C=O) (Jain and Mehata, 2017). Интересно, что валентные колебания карбонила в этом диапазоне ранее наблюдались в экстракте корня дикорастущего женьшеня (Kong and Yu, 2007). Пики примерно при 1647 и 1538  $\text{cm}^{-1}$  представляют собой типичные полосы амида I и амида II белков и полипептидов, которые связаны с валентными колебаниями связей (C=O) и (N-H), соответственно (Mude et al., 2009).



**Рисунок 27** – Спектры FTIR Ag-НЧ, полученных с использованием экстрактов клеточных линий *P. ginseng* (А) 1с, (Б) *rolC*-кallусов и (В) бородатых корней.

### 3.7. Получение трансгенных растений и клеточных культур *N. tabacum*, экспрессирующих ген силикатеина

Согласно нашим данным по вкладу различных биомолекул в восстановительный потенциал каллусной культуры воробейника, активность белков была незначительна по сравнению с полисахаридами и особенно вторичными метаболитами. Однако общее содержание белков в экстракте оказалось сравнительно велико и было сопоставимо с таковым у полисахаридов. С учетом этого фактора вклад белков в биосинтетическую активность культуры *L. erythrorhizon* всего в два раза уступал вторичным метаболитам. Из литературных источников известно, что некоторые индивидуальные белки способны индуцировать формирование НЧ металлов. В частности, нитратредуктаза из *F. oxysporum* вызывала восстановление ионов

серебра (Kumar et al., 2007). Каталитический белок силикатеин семейства цистеиновых папаин-подобных протеаз, иммобилизованный на поверхности модифицированных нанопроводов  $\text{TiO}_2$ , был способен к формированию нанокристаллов золота (Tahir et al., 2006). Кроме того, рекомбинантный силикатеин опосредовал синтез НЧ диоксида титана и циркония (Tahir et al., 2005). Принимая во внимание возможность гетерологичной экспрессии белков в клетках растений, мы решили проверить предположение о возможности изменения их восстановительного потенциала за счет присутствия гетерологичного белка известного своей способностью стимулировать формирование НЧ. Для этого нами были использованы культуры табака, содержащие ген, кодирующий белок силикатеин.

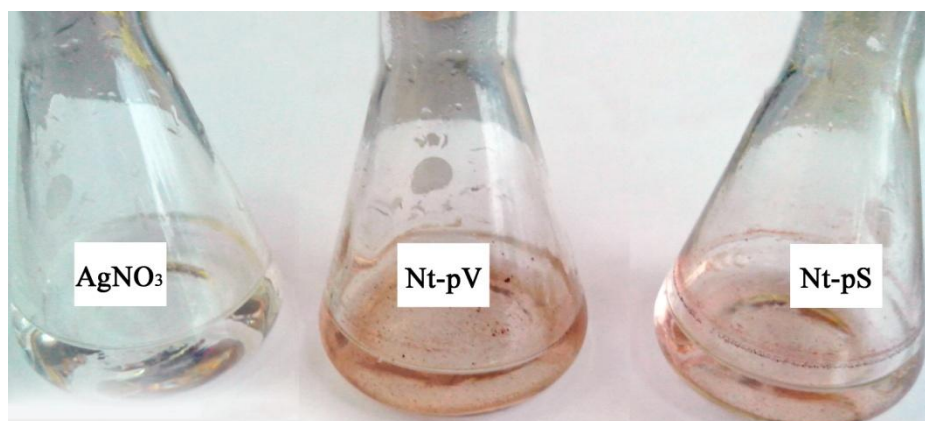


**Рисунок 28** – Внешний вид трансгенных линий растений (А) Nt-pV и (Б) Nt-pS *N. tabacum*.

Среди четырех генов силикатеинов *L. oparinae* *LoSilA1* экспрессировался как минимум в 10 раз выше других (Kozhemyako et al., 2010) и был выбран для нашего исследования. Чтобы создать силикатеин-экспрессирующую систему на основе растений, ранее была клонирована нуклеотидная последовательность гена *LoSilA1*, которая соответствует зрелой форме фермента. В данном эксперименте были использованы трансгенные клеточные линии Nt-cV (клеточная линия, трансформированная пустым вектором, т.е. экспрессирующая только ген *nptII* неомицинофосфотрансферазы, обеспечивающей устойчивость к канамицину) и Nt-cS (клеточная линия, экспрессирующая *nptII* и ген *LoSilA1*). Трансгенные растения регенерировали из соответствующих клеточных культур с получением линий Nt-pV, Nt-pS (Рисунок 28). Линии Nt-cV и Nt-pV использовали в качестве контролей.

### 3.8. Восстановительные свойства *LoSilA1*-трансгенных клеточных культур и растений табака

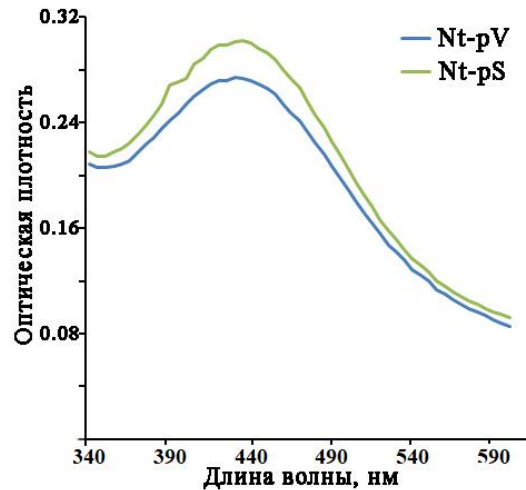
Согласно полученным ранее результатам, каллусные линии табака Nt-cV и Nt-cS проявляли выраженную способность к формированию Ag-НЧ. По интенсивности пиков ППР восстановительная способность *LoSilA1*-экспрессирующей культуры табака оказалась в 3,6 раза выше, чем у экстрактов нетрансформированных каллусов (Kozhemyako et al., 2010). Других значимых отличий между контрольной и трансгенной культурами не наблюдалось и, вероятно, наблюдаемый эффект связан с накоплением в клетках белка *LoSilA1*.



**Рисунок 29** – Типичные изображения растворов Ag-НЧ, полученных с использованием трансгенных растений Nt-pV и Nt-pS.

Мы предположили, что регенированные *LoSilA1*-трансгенные растения табака также будут обладать повышенной способностью к формированию НЧ. Для проверки данного предположения, мы исследовали способность экстрактов растений Nt-pV и Nt-pS к восстановлению ионов серебра. Однако, исследованные нами экстракты растений Nt-pV и Nt-pS, не вызвали изменения цвета реакционных смесей, характерного для культур Nt-cV и Nt-cS. Вместо этого мы наблюдали образование коричневого осадка на дне и налета на стенках реакционных сосудов (Рисунок 29). Такой результат был довольно неожиданным, поскольку экстракты растений *N. tabacum* ранее использовались для восстановления ионов серебра (Prasad et al., 2011). Однако в этих работах процедура приготовления экстрактов существенно отличалась от нашего способа. В первом случае авторы использовали длительное кипячение листьев табака (Kuchekar, Patil and Nan, 2015), что привело бы к необратимой денатурации белков, в том числе *LoSilA1*. В другом варианте авторы использовали для приготовления экстракта буферный раствор Трис-НСl (Prasad et al., 2011), тогда как в наших условиях такой способ вызывал помутнение реакционной смеси даже в контроле. Полученные нами с помощью Nt-pV и Nt-pS растворы (Рисунок 29) сами по себе не имели типичных для Ag—НЧ полос ППР.

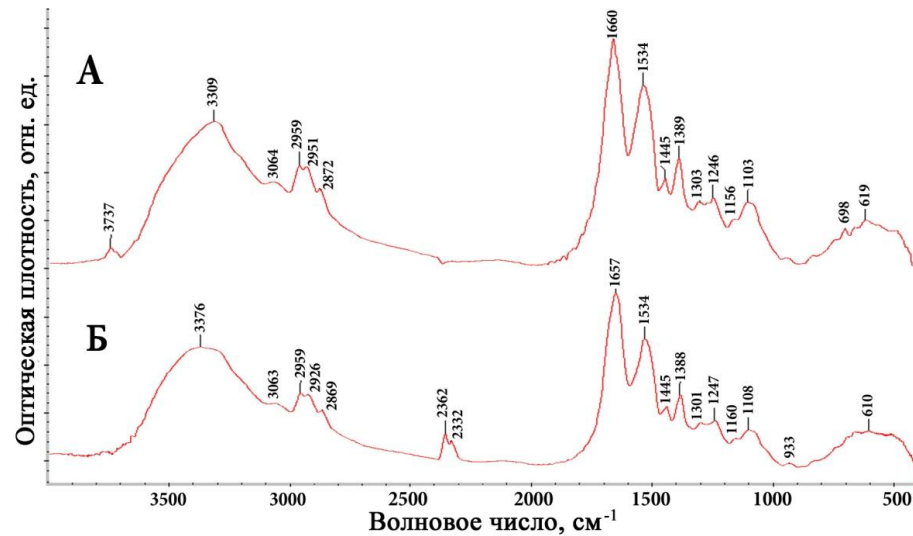
Однако при воздействии на осадки ультразвукового излучения, нам удалось добиться их частичного растворения. При этом формы полос ППР Ag-НЧ были широкими, а их максимумы не отличались у контрольных и трансгенных растений (Рисунок 30). Таким образом, параметры экстракции могут значительно влиять на эффективность синтеза НЧ с использованием биологического подхода. В нашем случае, вероятно, компоненты растения индуцировали значительную агрегацию наноструктур.



**Рисунок 30** – Спектры поглощения Ag-НЧ, полученных с использованием трансгенных растений Nt-pV и Nt-pS.

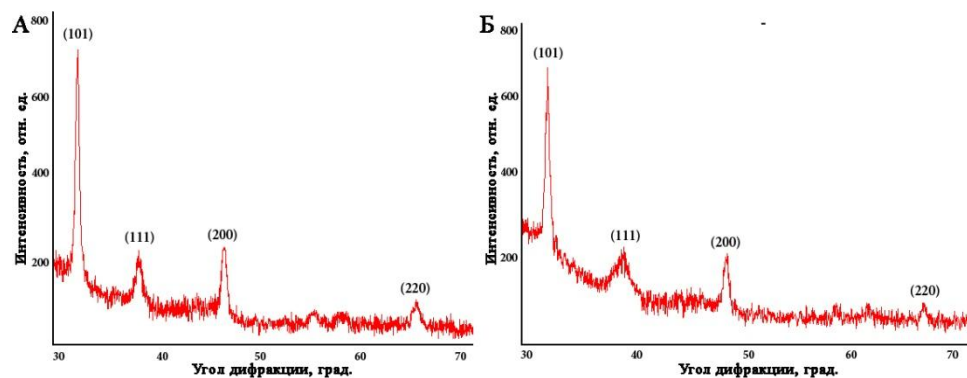
**Характеристика Ag-НЧ, полученных с использованием *LoSilA1*-трансгенных каллусов и растений табака.** Типичные спектры FTIR, полученные Ag-НЧ, представлены на Рисунке 31. Пики поглощения около  $3376$  и  $3063\text{ см}^{-1}$  соответствуют валентным колебаниям группы (N–H) (Kong and Yu, 2007). Полоса, наблюдаемая при  $2362\text{ см}^{-1}$  может быть отнесена к группе первичного амина ( $-\text{NH}_2$ ) (Jayaseelan et al., 2012). Полоса амида I (между  $1600$  и  $1690\text{ см}^{-1}$ ) в основном связана с валентным колебанием  $\text{C}=\text{O}$  (Amin et al., 2012). Пики поглощения в области  $1388\text{--}1445\text{ см}^{-1}$  и  $1247\text{--}1301\text{ см}^{-1}$  соответствуют амидным группам II и III (растяжение (C–N), изгиб (N–H)), соответственно (Ayala-Núñez et al., 2009). Пик  $1534\text{ см}^{-1}$  может быть отнесен к симметричным валентным колебаниям ( $-\text{COO}-$ ) (карбоксилат-ион) групп аминокислотных остатков со свободными карбоксилатными группами белка (Mude et al., 2009). Кроме того, поглощение в области  $1100\text{--}1160\text{ см}^{-1}$  можно отнести к полосам эфира (C–O) и ацетального кольца (C–O–C) (Shankar et al., 2004). Результаты анализа подтвердили, что белки, присутствующие в экстракте Nt-cS, могут быть ответственны за восстановление ионов серебра. Аналогичные FTIR-спектры были получены для инсулина, включенного в матрицу  $\text{SiO}_2$  (Mansur et al., 2002), и для белков *Aspergillus tubingensis*, адсорбированных на Ag-НЧ (Ballottin

et al., 2016). Кроме того, силикатеиновые белки, иммобилизованные на наночастицах, имеют такие же характерные амидные полосы (Natalio et al., 2010).



**Рисунок 31** – Спектры FTIR Ag-НЧ, полученных с использованием экстрактов трансгенных клеточных культур (А) Nt-cV и (Б) Nt-cS.

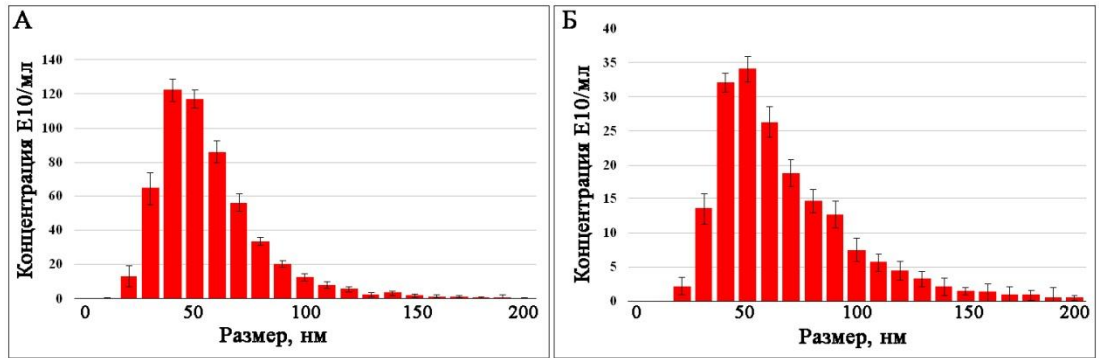
XRD анализ кристаллической природы Ag-НЧ (Рисунок 32) выявил пики при величине  $2\theta=32,26, 38,14, 46,27, 64,49$ , соотносящиеся с плоскостями отражения Брэгга (101), (111), (200) и (220). Результаты XRD демонстрируют, что синтезированные частицы представляют собой ГЦК структуры серебра, подобные полученным нами ранее и другим биологически синтезированным Ag-НЧ (Govarthanan et al., 2016). Средний размер Ag-НЧ, рассчитанный по формуле Шеррера на основании данных XRD составил 12 нм.



**Рисунок 32** – Спектры XRD Ag-НЧ, полученных с использованием экстрактов трансгенных клеточных культур (А) Nt-cV и (Б) Nt-cS.

Более точное измерение распределения размеров частиц с помощью метода NTA показало, что Ag-НЧ, полученные с использованием Nt-cS имели размер  $63,6\pm 8$  нм, что достоверно меньше, чем у частиц, полученных с помощью контрольной культуры Nt-cV –

53,5±7 нм (Рисунок 33). Дзета-потенциал синтезированных НЧ составил –30,2 и –29,4 мВ для образцов Nt-cV и Nt-cS, соответственно, что указывает на высокую степень стабильности синтезированных НЧ (Bhattacharjee, 2016). Общая концентрация Ag-НЧ, измеренная с помощью НТА в образце Nt-cV, была в 3,1 раза ниже, чем в образце Nt-cS.



**Рисунок 33** – Анализ НТА Ag-НЧ, полученных с использованием трансгенных клеточных культур (А) Nt-cV и (Б) Nt-cS.

Многие белки и пептиды взаимодействуют со специфическими неорганическими соединениями и способны контролировать образование наноструктур как *in vitro*, так и *in vivo* (Hartono, Nody and Yung, 2010). Например, контролируемый синтез кристаллов магнетита, был достигнут с помощью рекомбинантного белка Mms6, полученного из *Magnetospirillum magnet* (Amemiya et al., 2007), а также в мезенхимальных стволовых клетках человека, трансфицированных геном *mms6* (Elfick et al., 2017). Связывающие серебро пептиды AG3, AG4 и AG5 служат матрицами для зарождения и роста Ag-НЧ в растворе (Naik et al., 2002) и могут использоваться для управления взаимодействием бактерий с тяжелыми металлами (Singh et al., 2018). Периплазматический шаперон ионов серебра SilE связывает Ag<sup>+</sup> и способствует устойчивости клеток к серебру (Asiani et al., 2016). Кластер генов *Sil* участвует во внеклеточном синтезе НЧ меди и серебра (Ramanathan, 2011). Сходным образом белок силикатеин способствует образованию биокремнезема в природе (Kisailus et al., 2006; Kisailus et al., 2005), тогда как рекомбинантные силикатеины способствуют синтезу, как диоксида кремния, так и НЧ металлов (Tahir et al., 2004). Белки часто связаны с НЧ металлов, полученных путем биологического синтеза с использованием растительных экстрактов (Li et al., 2018). Молекулярный механизм, лежащий в основе индуцированного белками восстановления ионов металлов, зависит от аминокислотного состава и каталитической активности белков, участвующих в образовании НЧ (Li et al., 2018; Bradford, 1976). Определенные аминокислотные остатки должны играть ключевую роль в этом процессе, включая тирозин (Lee et al., 2008), триптофан (Tan, Lee and Wang, 2010), гистидин (Kracht et al., 2015), пролин и

гидроксилсодержащие аминокислотные остатки (Naik et al., 2002). Интересно, что внеклеточные катионные белки из *Fusarium oxysporum*, которые очень похожи на силикатеин, оказались ответственными за синтез НЧ диоксида циркония (Bansal et al., 2004). Более того, другие виды грибов рода *Fusarium* не могли производить нанокристаллический диоксид циркония.

Таким образом, наши результаты и литературные данные позволяют предположить, что экспрессия определенных белков с восстановительными свойствами в культурах клеток растений может значительно повлиять на их способность к получению НЧ. Неспособность трансгенных растений табака индуцировать эффективное формирование НЧ, которую мы наблюдали в экспериментах, пока остается не вполне понятна. Вероятно, в дальнейшем потребуется проведение дополнительных исследований параметров приготовления экстрактов или получение новых видов трансгенных растений для более подробного изучения данного феномена.

### **3.9. Биологические активности наночастиц**

#### **3.9.1. Элиситорная активность наночастиц серебра**

Ионы серебра (в форме  $\text{AgNO}_3$ ) уже сравнительно давно используются в качестве регулятора продукции этилена, органогенеза и эмбриогенеза у растений, а также в качестве элиситора, стимулирующего продукцию вторичного метаболизма в культурах клеток (Neves M. et al., 2021). Поскольку биосинтез ценных биологически-активных соединений имеет важное значение в биотехнологии растений, мы решили изучить способны ли Ag-НЧ, полученные биологическим способом оказывать влияние на накопление вторичных метаболитов.

В качестве экспериментальных культур модельных и лекарственных растений нами были выбраны культуры *A. thaliana*, *V. vinifera* и *C. cardunculus*. Как  $\text{Ag}^+$ , так и Ag-НЧ вызывали дозозависимое угнетение роста культур *C. cardunculus* и *V. vinifera*. Культура артишока оказалась более чувствительной к воздействию обоих элиситоров, так как они вызывали угнетение роста до 81% от контроля, в то время как в культуре винограда угнетение роста не превышало 62%. При этом рост культуры *A. thaliana* даже при максимальной дозе элиситоров подавлялся лишь на 40%, а в присутствии 5 мкг/мл  $\text{AgNO}_3$  и Ag-НЧ наблюдали увеличение биомассы в 1,4 раза по сравнению с контрольными условиями.

**Таблица 14.** Содержание кафеилхинных кислот в клеточной линии *C. cardunculus*, обработанной  $\text{AgNO}_3$  и Ag-НЧ

	Концентрация элистора, мкг/мл	Сухая биомасса, г/л	Сумма кафеилхинных кислот <sup>†</sup> , мг/г	Продуктивность, мг/л
	0	69,10 ± 4,00	4,16 ± 0,17	287,46 ± 16,64
$\text{AgNO}_3$	5	30,07 ± 2,53*	24,60 ± 1,45*	739,64 ± 62,32*
	15	15,70 ± 2,47*	14,46 ± 1,59*	227,02 ± 35,67
	30	14,13 ± 1,33*	9,61 ± 0,63*	135,82 ± 12,81*
Ag-НЧ	5	37,97 ± 2,67*	18,72 ± 0,92*	710,74 ± 49,92*
	15	12,13 ± 0,92*	11,08 ± 0,59*	134,44 ± 10,16*
	30	12,97 ± 1,6*	9,98 ± 0,90*	129,41 ± 16,63*

**Примечание.** <sup>†</sup> Сумма 3-, 5-моно- и 1,3-, 1,4-, 1,5-, 3,4-, 3,5-, 4,5-ди-кафеилхинных кислот. Данные представлены как средние значения ± стандартная ошибка, \*  $P < 0,05$ .

Оба элистора оказывали значительное влияние на накопление вторичных метаболитов в изученных клеточных культурах. В культуре артишока (Таблица 14) максимальный положительный эффект на накопление кафеилхинных кислот в 5,9 раз наблюдали при добавлении 5 мкг/мл  $\text{AgNO}_3$ , однако действие Ag-НЧ было менее значительным и НЧ стимулировали накопление лишь в 4,5 раза относительно контроля. В культуре винограда даже минимальная доза  $\text{AgNO}_3$  и Ag-НЧ повысила накопление стильбенов в 33 и 27 раз, соответственно (Таблица 15). Как и в случае с культурой артишока, нитрат серебра оказался более мощным элистором и оказал наибольшее влияние в дозе 30 мкг/мл, при которой общее содержание стильбенов выросло в 55 раз, тогда как Ag-НЧ только в 44 раза.

**Таблица 15.** Содержание стильбенов в клеточной культуре *V. vinifera*, обработанных  $\text{AgNO}_3$  и Ag-НЧ

	Концентрация элистора, мкг/мл	Сухая биомасса, г/л	Сумма стильбенов <sup>†</sup> , мкг/г	Продуктивность, мг/л
	0	17,82 ± 1,64	22,27 ± 1,20	0,40 ± 0,04
$\text{AgNO}_3$	5	16,72 ± 1,17	740,94 ± 30,31*	12,39 ± 0,89*
	15	6,34 ± 0,58*	1127,96 ± 60,61*	7,15 ± 0,66*
	30	6,92 ± 1,17*	1220,01 ± 117,04*	8,44 ± 1,42*
Ag-НЧ	5	18,08 ± 1,34	609,93 ± 26,27*	11,03 ± 0,81*
	15	8,09 ± 0,79*	337,90 ± 19,09*	2,73 ± 0,27*
	30	6,78 ± 1,14*	979,42 ± 96,16*	6,64 ± 1,12*

**Примечание.** <sup>†</sup> Сумма т-резвератрол ди-гликозида, пiceiда, т-резвератрола, виниферина и тримеров резвератрола. Данные представлены как средние значения ± стандартная ошибка, \*  $P < 0,05$ .

Что касается культуры арабидопсиса (Таблица 16), было установлено, что оба элиситора проявляли дозозависимое стимулирующее действие на накопление индольных глюкозинолатов. При этом, минимальная концентрация  $\text{AgNO}_3$  и  $\text{Ag-NЧ}$  вызывала наибольший стимуляторный эффект на накопление вторичных метаболитов – в 1,8 и 2,9 раза, соответственно. Стоит отметить, что во всех случаях увеличение концентрации элиситора сопровождалось некоторым снижением его стимулирующей активности. Сильнее всего обратно-пропорциональное влияние эффекторов на биосинтез проявлялось в опытах на культуре арабидопсиса: при дозе 30 мкг/мл общее содержание глюкозинолатов достоверно не отличалось от контрольных условий. Предполагается, что НЧ воздействуют на вторичный метаболизм клеток растений посредством активации продукции АФК (Marslin, Sheeba and Franklin, 2017). В этой связи можно предположить, что избыточная продукция АФК приводит к угнетению клеточных процессов. По всей видимости, способность стабилизировать содержание АФК посредством антиоксидантных систем отличается в изученных культурах, чем и объясняются различия в наблюдаемых эффектах.

**Таблица 16.** Содержание индольных глюкозинолатов в клеточной культуре *A. thaliana*, обработанных  $\text{AgNO}_3$  и  $\text{Ag-NЧ}$

	Концентрация элиситора, мкг/мл	Сухая биомасса, г/л	Сумма индольных глюкозинолатов <sup>†</sup> ,	Продуктивность, мкМ/л
	0	8,40 ± 1,17	3,31 ± 0,32	27,80 ± 3,86
$\text{AgNO}_3$	5	12,10 ± 2,00	6,07 ± 0,70*	73,45 ± 12,14*
	15	4,07 ± 0,73*	4,65 ± 0,59	18,91 ± 3,41*
	30	4,80 ± 1,13*	4,81 ± 0,79	23,09 ± 5,45
$\text{Ag-NЧ}$	5	12,43 ± 1,67	9,75 ± 0,91*	121,23 ± 16,25*
	15	6,15 ± 1,28*	2,77 ± 0,40	17,04 ± 3,55*
	30	4,82 ± 1,33*	4,14 ± 0,80	19,94 ± 5,52

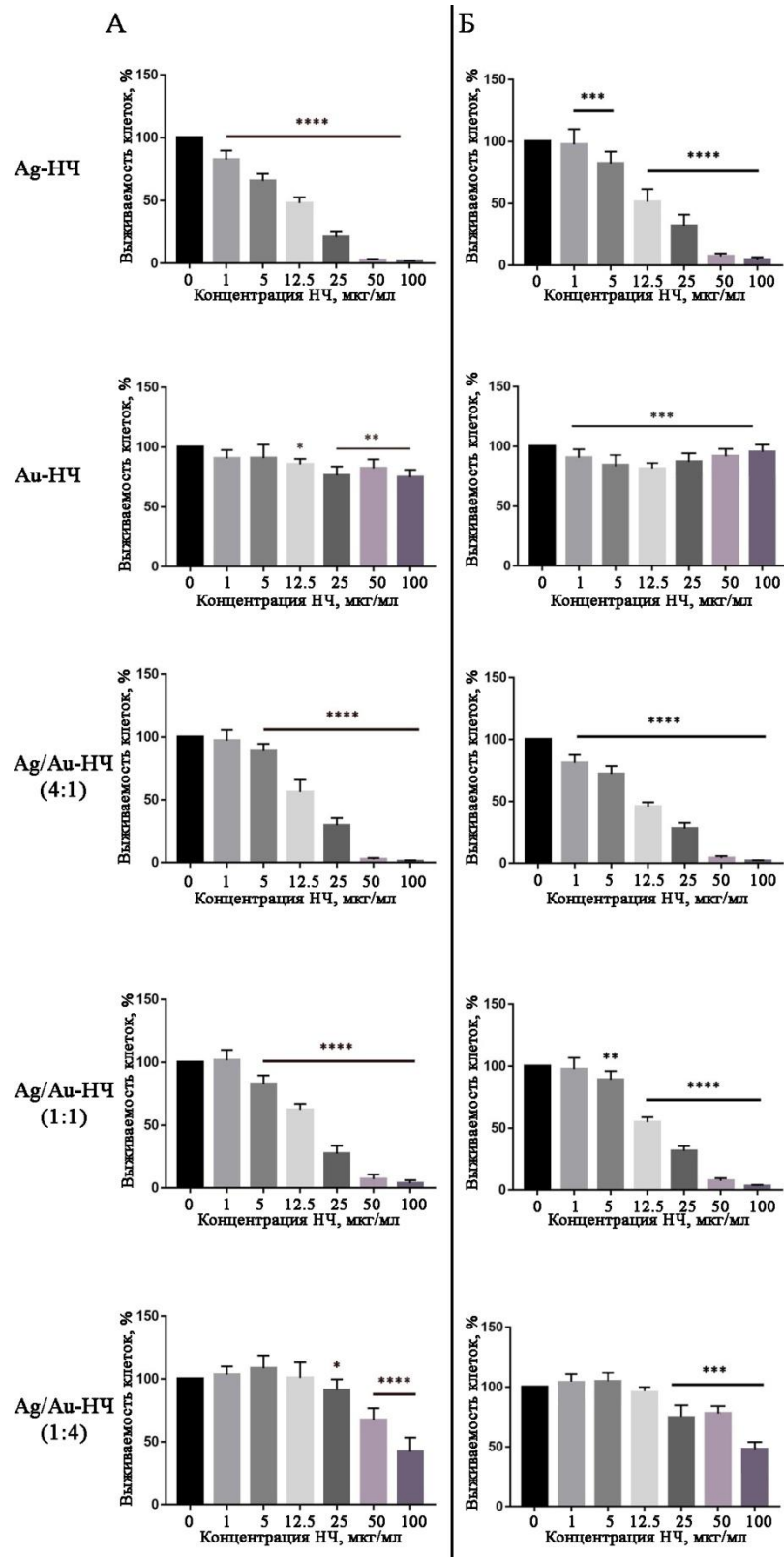
**Примечание.** <sup>†</sup> Сумма индолил-3-метилглюкозинолат глюкобрассицина, 4-метоксииндолил-3-метилглюкозинолат 4-метоксиглюкобрассицина и 1-метоксииндолил-3-метилглюкозинолат неоглюкобрассицина. Данные представлены как средние значения ± стандартная ошибка, \*  $P < 0,05$

Таким образом, наши данные показывают, что  $\text{Ag-NЧ}$  были наиболее эффективны в стимуляции накопления индольных глюкозинолатов в культуре арабидопсиса, в то время как  $\text{AgNO}_3$  оказался более перспективным для активации синтеза вторичных метаболитов в культурах артишока и винограда. При этом даже с учетом существенного ингибирования роста клеток, общая продуктивность культуры артишока в присутствии 5 мкг/мл обоих элиситоров была в 2,6 раза выше, чем в контроле. В культуре винограда наибольшее увеличение продукции

стильбенов – в 31 раз по сравнению с контролем – также отмечено при дозе нитрата серебра 5 мкг/мл, тогда как Ag-НЧ активировали накопление этих соединений до 28 раз. Содержание глюкозинолатов увеличивалось в 4,4 раза при воздействии 5 мкг/мл Ag-НЧ, в то время как нитрат серебра активировал их накопление лишь в 2,6 раза при тех же условиях. Недавно способность Ag-НЧ стимулировать биосинтез вторичных метаболитов была показана на целых растениях арабидопсиса (Kruszka et al., 2019), что согласуется с нашими данными.

### **3.9.2. Цитотоксическая активность Ag-НЧ и Au-НЧ, полученных с использованием каллусной культуры воробейника**

Цитотоксичность биосинтезированных металлических НЧ оценивали *in vitro* в отношении клеточных линий нейробластомы мыши (N2A) и эмбриональных фибробластов (3T3) с использованием МТТ-анализа (колориметрического теста для оценки метаболической активности клеток). В большинстве случаев НЧ снижали жизнеспособность клеток N2A и NIH 3T3 дозозависимым образом (Рисунок 34).



**Рисунок 34** – МТТ-анализ жизнеспособности клеток (А) нейробластомы N2A и (Б) эмбриональных фибробластов NIH 3T3 мыши в присутствии 1, 5, 12,5, 25, 50 и 100 мкг/мл Ag-НЧ, Au-НЧ и биметаллических Ag/Au-НЧ, полученных с использованием экстракта каллусной культуры *L. erythrorhizon*. Данные представлены как средние значения  $\pm$  стандартная ошибка среднего, \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$ , \*\*\*\*  $P < 0,0001$ .

В частности, обработка культур 3T3 и N2A биметаллическим Ag/Au-(1:4)-НЧ и Ag/Au-(1:1)-НЧ не вызывала гибели клеток при концентрации 1 мкг/мл, но значительно ( $P < 0,0001$ ) снижала жизнеспособность клеток при 5 мкг/мл и более высоких дозах. Стоит отметить, что в исследуемых условиях наибольший цитотоксический эффект в обеих клеточных линиях проявил препарат Ag/Au-(4:1)-НЧ. Существенных различий в токсичности биосинтезированных НЧ в клетках нейробластомы и эмбриональных фибробластов не обнаружено. Au-НЧ обладали самой низкой цитотоксичностью среди протестированных НЧ (Рисунок 34). Ранее сообщалось, что обработка клеточных линий MCF7, A549 и Hep2 Ag-НЧ, синтезированных с использованием экстракта *Beta vulgaris*, показала снижение жизнеспособности клеток с увеличением концентрации Ag-НЧ (Venugopal et al., 2017). Аналогичные результаты были получены при изучении Ag-НЧ, полученных с использованием экстракта листьев *Andrographis echinoides*, в отношении клеток рака молочной железы MCF7 (Elangovan et al., 2015). Botha с соавторами отметил, что Ag-НЧ и биметаллические Ag/Au-НЧ, синтезированные с использованием экстракта растения *Solidago canadensis*, показали высокую токсичность для клеток H4IIE-luc гепатомы крысы и HuTu-80 рака кишечника человека, в то время как Au-НЧ того же происхождения не были токсичными (Elangovan et al., 2015; Li et al., 2018; Kobylinska et al., 2020; Wang et al., 2017; Venugopal et al., 2017). Аналогично, Au-НЧ, синтезированные с помощью белковой фракции *Deinococcus radiodurans*, показали низкую цитотоксичность в отношении нормальных эпителиальных клеток (Li et al., 2018). Интересно, что биметаллические Ag/Au-(3:1)-НЧ, синтезированные с помощью химического восстановления, имели максимальный цитотоксический эффект в раковых клетках по сравнению с биметаллическими Ag/Au-НЧ в соотношении (1:1) и (1:3) (Katifelis et al., 2018). Более того, их токсичность в незлокачественных клеточных линиях была менее выраженной, и этот специфический для клеток эффект был обусловлен избытком триптофана, который увеличивал избирательную токсичность НЧ.

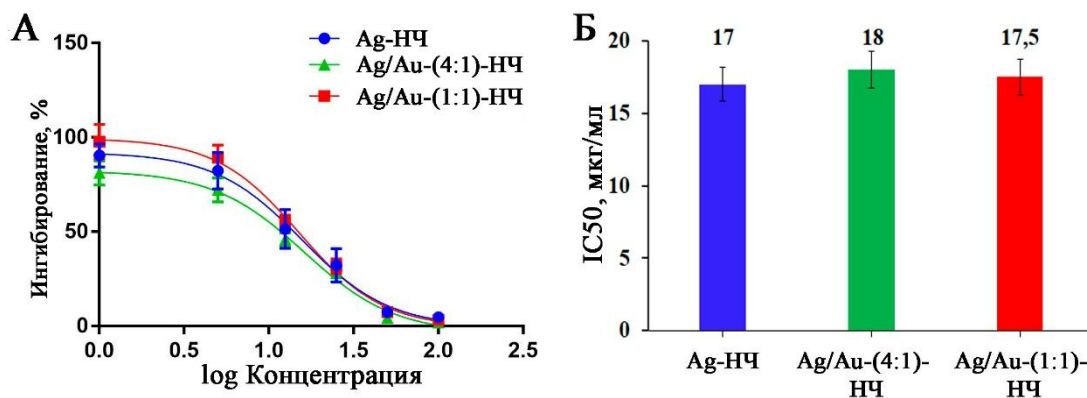
Несмотря на многочисленные работы, описывающие цитотоксическую активность металлических НЧ, механизм их взаимодействия с живыми клетками сложен и до конца не выяснен. Известно, что НЧ способны выделять ионы металлов в цитозоле и в ядре (Elangovan et al., 2015). Такие ионы легко взаимодействуют с азотистыми основаниями и фосфатными группами ДНК. Кроме того, ионы металлов способны взаимодействовать с функциональными группами белков внутри клетки, включая те, которые аномально экспрессируются во время неопластической трансформации, тем самым подавляя их активность (Szucova et al., 2006). С другой стороны, известно, что металлические НЧ вызывают окислительный стресс, который может представлять собой основной фактор, лежащий в основе их противоопухолевой активности (Xia, Ma and Wang, 2016). Ag-НЧ, Au-НЧ и Ag/Au-НЧ могут индуцировать

генерацию АФК посредством Фентон-подобных реакций (Navalon et al., 2010), с последующим окислением белков и липидов, повреждением молекул ДНК и, как следствие, активацией путей, ведущих к гибели клеток через апоптоз, некроз и аутофагию (Mohammadinejad et al., 2018). Принято считать, что Ag-НЧ обладают более высокой цитотоксической активностью, по сравнению с Au-НЧ. Mukha и соавторы (Mukha et al., 2017) предположили, что этот эффект связан с двукратной разницей атомных масс серебра и золота (107,87 и 196,97, соответственно). Более того, разные клеточные линии могут различаться по чувствительности к одним и тем же НЧ (Zhou, Yuan and Wei, 2011).

Концентрация, размер, форма, поверхностный заряд и модификация поверхности металлических НЧ также вносят значительный вклад в механизм их цитотоксического действия (Shankar et al., 2004). Например, треугольные НЧ, обладают более высоким биоцидным действием по сравнению со сферическими НЧ (Zhou, Yuan and Wei, 2011). Было обнаружено, что НЧ более маленького размера вызывают самую сильную дозозависимую токсичность (Mukha et al., 2017; Shmarakov et al., 2017). Однако имеется очень мало данных о возможной корреляции между морфологией биметаллических НЧ и их цитотоксическими свойствами. Shmarakov и соавторы (Shmarakov et al., 2017) показали, что противоопухолевая активность сильно зависит от топологического распределения атомов Ag и Au в биметаллических НЧ обоих типов – ядро-оболочка и сплав. Наиболее выраженные эффекты были получены при покрытии серебряного ядра оболочкой из золота. В другом исследовании было показано, что цитотоксический эффект биметаллических НЧ связан с относительным количеством золота в наноструктуре (Venugopal et al., 2017). В частности, цитотоксичность в отношении фибробластов мыши снижалась с увеличением молярного отношения Au в различных композициях биметаллических частицах типа ядро-оболочка (Venugopal et al., 2017).

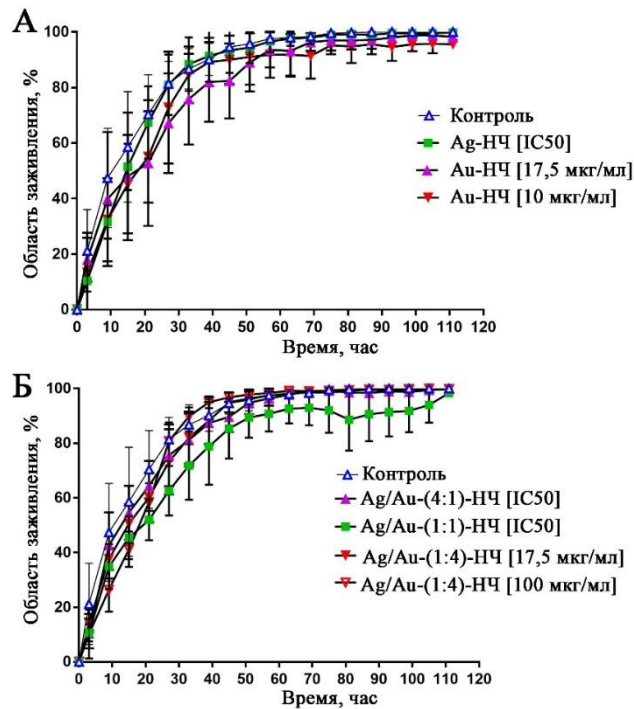
### **3.9.3. Влияние Ag-НЧ и Au-НЧ, полученных с использованием каллусной культуры воробейника, на миграцию фибробластов**

На основании данных о жизнеспособности клеток, Ag-НЧ, а также биметаллические Ag/Au-(4:1)-НЧ и Ag/Au-(1:1)-НЧ продемонстрировали самую высокую ингибирующую активность в отношении клеточной линии NIH 3T3. Расчетные величины концентрации полумаксимального ингибирования (IC<sub>50</sub>), для этих частиц составили 17, 18 и 17,5 мкг/мл, соответственно (Рисунок 35). Эти дозы были использованы для исследования влияния НЧ на миграцию клеток.



**Рисунок 35** – (А) Кривые зависимости эффекта дозы и (Б) значения концентрации полумаксимального ингибирования (IC<sub>50</sub>) Ag-НЧ, биметаллических Ag/Au-(4:1)-НЧ и Ag/Au-(1:1)-НЧ в отношении эмбриональных фибробластов мыши NIH 3T3. В качестве отрицательного контроля использовали клетки без добавления НЧ. Данные представлены как средние значения ± стандартная ошибка.

На основании данных МТТ анализа не представлялось возможным достоверно оценить значение IC<sub>50</sub> для Au-НЧ и Ag/Au-(1:4)-НЧ вследствие их низкой цитотоксичности. В этой связи для изучения миграции клеток в присутствии НЧ мы использовали две концентрации данных частиц, представляющие среднее значение IC<sub>50</sub> для других НЧ (17,5 мкг/мл) и наивысшую испытанную дозу частиц (100 мкг/мл). Как анализ заживления ран, так и оценка средней скорости миграции клеток показали, что испытанные НЧ не оказывали значительного влияния на миграцию фибробластов *in vitro* в наших условиях испытаний (Рисунок 36, Таблица 17). Ранее было показано, что Ag-НЧ, полученные с использованием экстракта *Manilkara zapota*, превосходят цисплатин по ингибированию скорости миграции клеток НСТ 116 (Ponmurugan et al., 2016). Удивительно, но самая низкая доза Au-НЧ вызвала наиболее выраженный эффект на скорость миграции 3T3 в наших экспериментах (Таблица 17). Аналогичные результаты были получены в отношении клеточной линии фибробластов кожи человека CCD1072Sk, обработанной Ag-НЧ и Au-НЧ (Jain and Kothari, 2014). Несмотря на то, что эти НЧ не влияли на жизнеспособность клеток, было обнаружено, что оба типа НЧ уменьшают скорость миграции клеток.



**Рисунок 36** – Анализ заживления ран, проведенный с помощью эмбриональных клеток фибробластов мыши линии NIH 3T3, обработанных (А) монометаллическими и (Б) биметаллическими НЧ. Клетки 3Т3 обрабатывали IC50 Ag-НЧ, Ag/Au-(4:1)-НЧ и Ag/Au-(1:1)-НЧ, либо 17,5 и 100 мкг/мл Au-НЧ и Ag/Au-(1:4)-НЧ и наблюдали в течение 5 дней. В качестве контроля использовали клетки без обработки НЧ. Данные представлены как средние значения  $\pm$  стандартная ошибка.

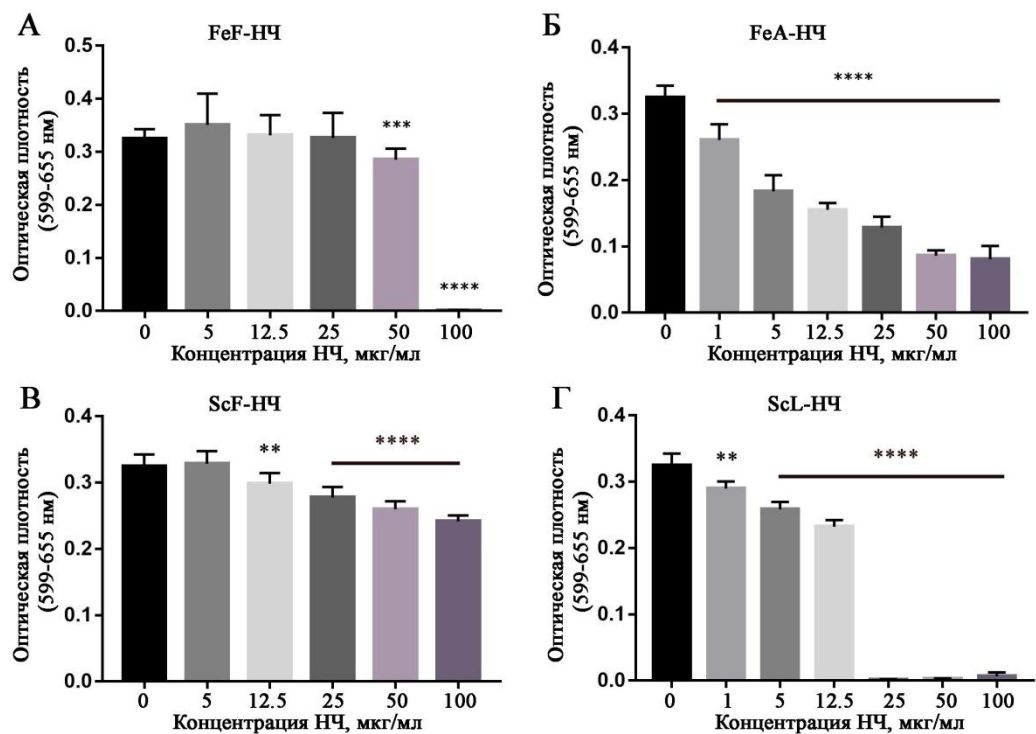
**Таблица 17.** Скорость миграции эмбриональных фибробластов мыши NIH 3T3 в присутствии металлических НЧ

Образцы	Средняя скорость, мкм/ч
NIH 3T3 Контроль (без добавления НЧ)	$5,06 \pm 2,49$
NIH 3T3 + AgНЧ [IC50]	$3,68 \pm 1,81$
NIH 3T3 + Ag/Au (4:1)-НЧ [IC50]	$3,96 \pm 1,49$
NIH 3T3 + Ag/Au (1:1)-НЧ [IC50]	$4,19 \pm 1,15$
NIH 3T3 + Ag/Au (1:4)-НЧ [17,5 нг/мкл]	$4,20 \pm 1,87$
NIH 3T3 + Ag/Au (1:4)-НЧ [100 нг/мкл]	$3,21 \pm 1,30$
NIH 3T3 + Au-НЧ [17,5 нг/мкл]	$2,84 \pm 0,87$
NIH 3T3 + Au-НЧ [100 нг/мкл]	$3,27 \pm 1,88$

**Примечание.** \*Клетки NIH 3T3 обрабатывали IC50 Ag-НЧ, Ag/Au-(4:1)-НЧ и Ag/Au-(1:1)-НЧ, либо 17,5 мкг/мл и 100 мкг/мл Au-НЧ и Ag/Au-(1:4)-НЧ. Данные представлены как средние значение  $\pm$  стандартная ошибка.

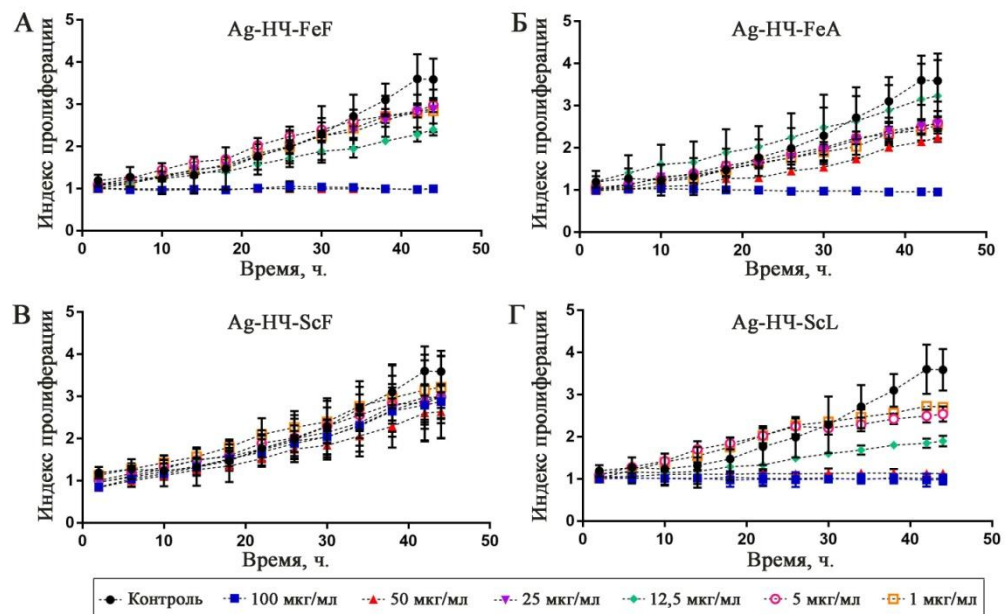
### 3.9.4. Цитотоксическая активность Ag-НЧ, полученных с использованием индивидуальных полисахаридов бурых водорослей

Цитотоксичность Ag-НЧ-FeA, Ag-НЧ-FeF, Ag-НЧ-ScF, Ag-НЧ-ScL в отношении клеток глиомы крысы (С6) была изучена с помощью МТТ-анализа результаты которого представлены на Рисунке 37. Мы обнаружили, что Ag-НЧ-FeA и Ag-НЧ-ScL оказывали значительный дозозависимый цитотоксический эффект на клетки С6. В случае Ag-НЧ-FeA максимальная цитотоксичность была достигнута при дозе 50 мкг/мл, тогда как Ag-НЧ-ScL продемонстрировали высокий цитотоксический эффект уже при 25 мкг/мл. В то же время токсичность Ag-НЧ-FeF и Ag-НЧ-ScF на клеточную линию С6 была менее выраженной. В частности, Ag-НЧ-FeF при 50 мкг/мл подавляли жизнеспособность клеток в 1,2 раза, однако полное подавление роста было достигнуто только при использовании 100 мкг/мл. Ag-НЧ-ScF продемонстрировал дозозависимую цитотоксичность, но гораздо менее значительную, по сравнению с другими образцами Ag-НЧ, т.е. клетки С6 продемонстрировали отличную жизнеспособность после обработки Ag-НЧ вплоть до 100 мкг/мл.



**Рисунок 37** – МТТ-анализ жизнеспособности клеток глиомы крысы С6 в присутствии 1, 5, 12,5, 25, 50 и 100 мкг/мл Ag-НЧ, полученных с использованием альгината (FeA) и фукоидана (FeF) из *F. evanescenes*, фукоидана (ScF) и ламинарана (ScL) из *S. cicharioides*. Данные представлены как средние значения ± стандартная ошибка, \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$ , \*\*\*\*  $P < 0,0001$ .

Кроме того, мы измеряли динамику роста клеток С6 в присутствии Ag-НЧ с помощью анализатора Cell-iQ® (Рисунок 38). Согласно полученным данным, 12,5 мкг/мл Ag-НЧ-FeA и Ag-НЧ-ScL было достаточно, чтобы ингибировать индекс пролиферации клеток С6 более чем в 2 раза. В то же время дальнейшее увеличение концентрации усиливало их антипролиферативное действие в течение всего периода наблюдения. По этому показателю цитотоксическая активность данных частиц была сопоставима с действием Ag-НЧ, полученных с использованием каллусной культуры воробейника. По полученным данным Ag-НЧ-FeF обладали промежуточной цитотоксичностью, поскольку их максимальный эффект проявлялся только при 100 мкг/мл. Ag-НЧ-ScF, по-видимому, менее эффективны в отношении глиомы крысы, поскольку клетки С6 оставались жизнеспособны при всех испытанных концентрациях НЧ.



**Рисунок 38** – Кривые роста клеток глиомы С6 крысы. Клеточные культуры С6 обрабатывали различными концентрациями (1, 5, 12,5, 25, 50 и 100 мкг/мл) (А) Ag-НЧ-FeF, (Б) Ag-НЧ-FeA, (В) Ag-НЧ-ScF, (Г) Ag-НЧ-ScL и контролировали в течение 44 часов. Данные представлены как средние значения ± стандартная ошибка.

Аналогичные результаты по цитотоксичности наблюдали для Ag-НЧ, полученных с помощью *Beta vulgaris*, в отношении клеточных линий MCF7, A549 и Hep2 (Venugopal et al., 2017). Ag-НЧ также были способны подавлять жизнеспособность нормальной линии клеток фибробластов кожи человека (HSF-PI-16) со значением IC50 равным 30,64 мкг/мл (Paknejadi et al., 2018). Однако Ag-НЧ, полученные с использованием фибринолитического фермента из

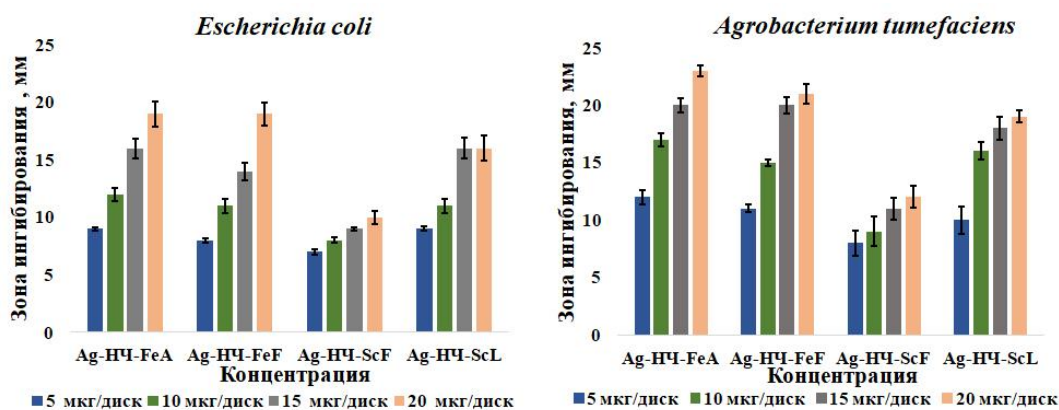
*Bacillus cereus*, не обладали значительной токсичностью в отношении линии мышинных макрофагов RAW 264.7 в концентрациях до 100 мкг/мл (Deepak et al., 2011).

Известно, что все полисахариды бурых водорослей практически нетоксичны (Malyarenko and Ermakova, 2017), не являются исключением и ранее применявшиеся полимеры (Usoltseva et al., 2019), а исследованные НЧ обладают разной степенью цитотоксичности. Вероятно, цитотоксичность НЧ варьируется в зависимости от свойств полимерных матриц.

### **3.9.5. Антибактериальная активность Ag-НЧ, полученных с использованием**

#### **индивидуальных полисахаридов бурых водорослей**

Далее мы изучили антибактериальные свойства Ag-НЧ, полученных на основе индивидуальных полисахаридов в отношении штаммов грамотрицательных бактерий *E. coli* XL1 Blue и *A. tumefaciens* ЕНА105. Наиболее показательным и быстрым методом оценки бактерицидной активности является диско-диффузионный метод. После обработки клеток *E. coli* и *A. tumefaciens* разными концентрациями Ag-НЧ мы обнаружили, что все протестированные НЧ значительно подавляли рост обеих бактерий в зоне вокруг диска в зависимости от концентрации (Рисунок 39). При использовании отрицательного контроля, то есть водных растворов каждого из полисахаридов, ингибирования роста не наблюдалось. Ранее, биоцидная активность в отношении *E. coli* была продемонстрирована для Ag-НЧ, синтезированных с использованием зеленой водоросли *Botryococcus braunii* (Arya et al., 2018), полисахаридов из экстрактов кактусов (Onditi et al., 2019) и полисахаридов, выделенных из красных морских водорослей (De Aragão et al., 2016). Было также установлено, что Ag-НЧ, покрытые комплексом хитозан-фукоидан проявляют максимальное биоцидное действие против грамотрицательных *E. coli* в концентрации 10 мкг/диск с зоной ингибирования, достигающей  $3,0 \pm 0,3$  мм (Li et al., 2008). Эти результаты хорошо согласуются с данными по нашим образцам Ag-НЧ-FeA, Ag-НЧ-FeF, Ag-НЧ-ScF, Ag-НЧ-ScL для которых при концентрации 10 мкг/диск средний диаметр зоны ингибирования роста *E. coli* составлял 3,5, 3, 1,5 и 3 мм, соответственно.



**Рисунок 39** – Диаметр зоны ингибирования роста тест-штаммов *E. coli* и *A. tumefaciens* в присутствии различных концентраций (5, 10, 15 и 20 мкг/диск) Ag-НЧ-FeF, Ag-НЧ-FeA, Ag-НЧ-ScF и Ag-НЧ-ScL. Данные представлены как средние значения  $\pm$  стандартная ошибка.

### 3.9.6. Антибактериальная активность Ag-НЧ, полученных с использованием *LoSilA1*-экспрессирующей каллусной культуры табака

Мы также изучили антибактериальную эффективность Ag-НЧ, полученных с помощью трансгенной культуры *N. tabacum*. Наши результаты показали, что бактерии *E. coli* XL1 Blue и *A. tumefaciens* ЕНА105 оказались чувствительны к воздействию Ag-НЧ в пределах тестируемого диапазона концентраций (Таблица 18). Было отмечено, что зона ингибирования увеличивалась с увеличением концентрации Ag-НЧ. Корреляционный анализ Пирсона выявил высокую положительную корреляционную зависимость между концентрацией Ag-НЧ и зоной ингибирования как у *E. coli*, так и у *A. tumefaciens* ( $r=0,880$ ,  $p=0,001$  и  $r=0,740$ ,  $p=0,015$ , соответственно).

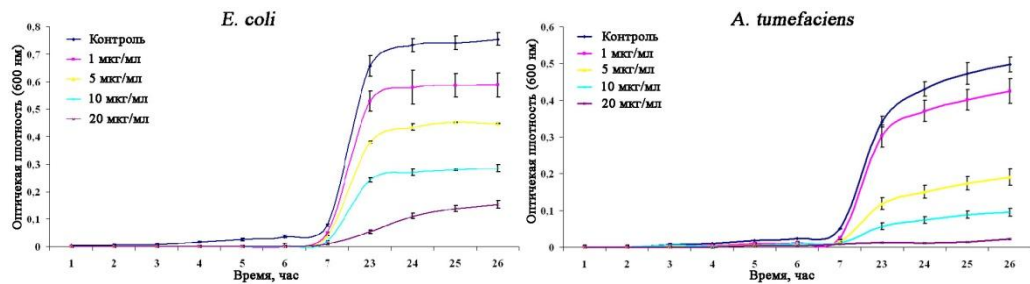
**Таблица 18.** Диаметр зоны ингибирования роста тест-штаммов *E. coli* и *A. tumefaciens* в присутствии различных концентраций Ag-НЧ (5, 10, 20, 40 и 60 мкг/диск), полученных с использованием *LoSilA1*-экспрессирующей каллусной культуры табака\*

Ag-НЧ, мкг/диск	5	10	20	40	60
<i>E. coli</i>	1,37 $\pm$ 0,15	1,42 $\pm$ 0,17	1,60 $\pm$ 0,18	1,72 $\pm$ 0,20	1,91 $\pm$ 0,23
<i>A. tumefaciens</i>	1,35 $\pm$ 0,17	1,48 $\pm$ 0,22	1,62 $\pm$ 0,23	1,75 $\pm$ 0,22	1,82 $\pm$ 0,25

**Примечание.** \*Данные представлены как средние значения  $\pm$  стандартная ошибка.

Интересно отметить, что по результатам диско-диффузионного анализа бактерицидная активность Ag-НЧ из культуры табака почти в два раза превышала активность частиц, полученных с использованием полисахаридов, за исключением Ag-НЧ-ScF. При этом такие важные в отношении антибактериальных свойств НЧ параметры, как размер и форма, для этих

образцов были сопоставимы и значительно не отличались. Этот результат может указывать на то, что помимо физико-химических характеристик, на биоцидные свойства частиц также влияет и способ их получения. В частности, биомолекулы, адсорбированные на частицах в области т.н. короны, оказывают влияние на биологические свойства наноструктур (Zhou, Yuan and Wei, 2011).



**Рисунок 40** – Кинетика роста *E. coli* и *A. tumefaciens* в присутствии Ag-НЧ. Данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка.

Кроме того, мы изучили динамику роста тест-штаммов бактерий в присутствии Ag-НЧ (Рисунок 40). Для анализа использовали тест-штаммы *E. coli* и *A. tumefaciens* (по  $10^6$  КОЕ каждого), обработанные различными концентрациями Ag-НЧ (1, 5, 10 и 20 мкг/мл). Кривые роста бактерий изучали путем измерения значений OD600 в интервале 1–26 часов роста. Из полученных графиков (Рисунок 40) следует, что скорость роста *E. coli* и *A. tumefaciens* снижается в соответствии с увеличением концентрации Ag-НЧ и временем воздействия. Значения IC50 для *E. coli* и *A. tumefaciens*, составили 7 и 4 мкг/мл, соответственно. В совокупности, наши данные исследования антибактериального эффекта Ag-НЧ, полученных с использованием экстракта Nt-cS, согласуются с результатами других авторов (Ahmed et al., 2016; Lomelí-Rosales et al., 2019).

### 3.9.7. Фунгицидная активность Ag-НЧ, полученных с использованием культуры бородатых корней женьшеня

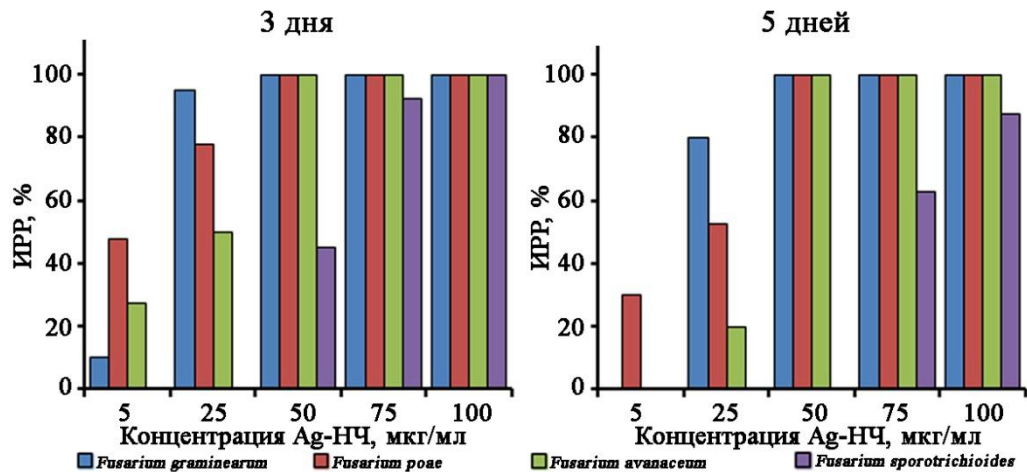
Изучение фунгицидных свойств Ag-НЧ было решено провести с использованием грибковых патогенов, ассоциированных местными сортами пшеницы: Лира 98 x 334-84, Далира и Хабаровчанка x Монакинка, произрастающими на территории Дальнего Востока. Для их выделения мы использовали естественно инфицированные семена, собранные на экспериментальных полях около г. Хабаровск в 2019 г. Всего, было выделено 22 изолята грибов рода *Fusarium*, а их последующая генетическая идентификация была проведена на основе частичных нуклеотидных последовательностей гена  $\beta$ -тубулина. Нами был выявлен высокий

уровень сходства между последовательностями  $\beta$ -тубулина вновь выделенных изолятов и последовательностями *Fusarium*, депонированными в базу данных GenBank (Таблица 19).

**Таблица 19.** Видовой состав и представленность выявленных фитопатогенных грибов рода *Fusarium* на распространенных в Дальневосточном регионе сортах пшеницы

Вид	Номер в базе данных GenBank	Гомология (%)	Кол-во изолятов
<i>Fusarium graminearum</i>	MW142289	<i>F. graminearum</i> strains 2812 (99%, MG063792.1), 1517 (99%, MG063790.1), 1495 (99%, MG063789.1)	111
<i>Fusarium poae</i>	MW142288	<i>F. poae</i> strains MAFF 305947 (99%, AB587073.1), FRC T-0796 (99%, AB587072.1), FRC T-0962	22
<i>Fusarium avenaceum</i>	MW142287	<i>F. avenaceum</i> strains SICAUCC 18-0001 (99%, MK253102.1), JA-0925 (99%, KP170733.1), Z172B	77
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	MW142286	<i>F. sporotrichioides</i> strains MAFF 236639 (99%, AB587076.1), ATCC 34914 (99%, AB587074.1), NRRL	22

Видовое распределение изолятов показало, что *F. graminearum* и *F. avenaceum* были самыми многочисленными видами, составляющими 81,8% всех изолятов, за которыми следовали *F. sporotrichioides* (9,1%) и *F. poae* (9,1%) (Таблица 19). Известно, что фузариоз колосьев ассоциирован с более чем 17 различными видами рода *Fusarium* (Ibrahim et al., 2020), но обычно преобладают виды *F. graminearum* Shwabe (телеоморф *Gibberella zeae*), *F. culmorum* (WG Smith) и *F. avenaceum* (телеоморф *G. avenaceae*) и их частота встречаемости зависит от климатических условий произрастания пшеницы.



**Рисунок 41** – ИРР (% от контроля) грибов *Fusarium graminearum*, *F. poae*, *F. avenaceum* и *F. sporotrichioides* под действием различных концентраций Ag-НЧ (5, 25, 50, 75 и 100 мкг/мл), полученных с использованием экстракта бородатых корней *P. ginseng*. В качестве контроля использовали соответствующие грибные изоляты без обработки НЧ. Данные представлены как средние значения  $\pm$  стандартная ошибка.

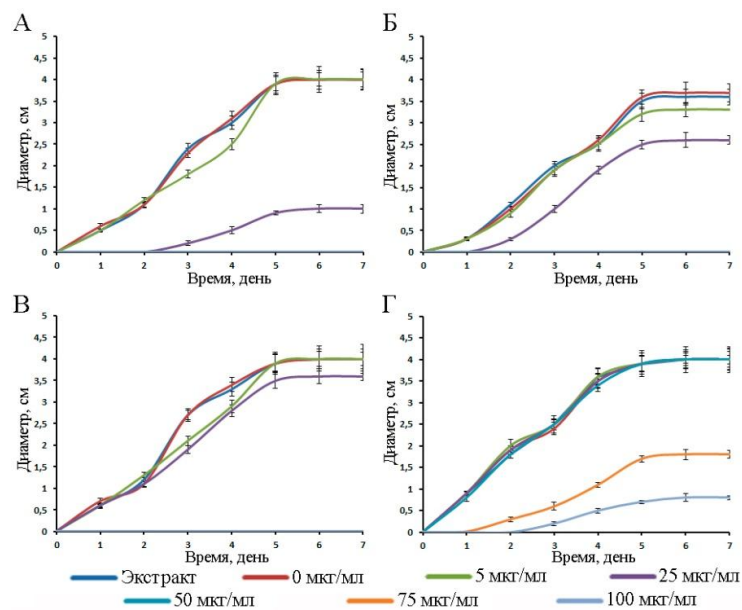
Противогрибковая эффективность Ag-НЧ, полученных с использованием культуры бородатых корней *P. ginseng*, оценивали путем измерения радиального роста мицелия в присутствии различных концентраций наносеребра. Процент ИРР, полученный после 3 и 5 дней воздействия биосинтезированных Ag-НЧ на определенные виды *Fusarium*, суммирован на Рисунке 41, а типовой вид чашек Петри приведен на Рисунке 42. Динамика изменения ИРР грибов представлена на Рисунке 43. В целом наносеребро продемонстрировало четкую дозозависимую противогрибковую активность. Однако фунгицидные свойства биосинтезированных Ag-НЧ в отношении разных видов *Fusarium* варьировали и уменьшались в следующем порядке: *F. graminearum*, *F. poae*, *F. avenaceum* и *F. sporotrichioides* (Рисунок 41). Так, для *F. graminearum*, *F. poae*, *F. avenaceum* 100% ингибирование роста наблюдалось при 50 мкг/мл, в то время как даже 100 мкг/мл Ag-НЧ подавляли рост *F. sporotrichioides* только на 88% (Рисунок 41). Также мы наблюдали заметное снижение споруляции всех изученных грибов после 5 дней инокуляции с Ag-НЧ по сравнению с контролем (Рисунок 42).

Этот результат указывает на то, что эти различные виды патогенов рода *Fusarium* могут использовать различные стратегии устойчивости, чтобы переносить токсичность Ag-НЧ. Аналогичные результаты фунгицидного действия наблюдали у различных металлических НЧ по отношению к переносимым через почву грибным фитопатогенам (Elangovan et al., 2015). В частности, Ag-НЧ, синтезированные с использованием фильтрата культуры *F. chlamyosporum* и *Penicillium chrysogenum*, показали значительную противогрибковую активность в отношении микотоксигенных грибов *A. flavus* и *A. ochraceus* в концентрации 47–51 мкг/мл (Stenglein, 2009).

Доза IC50 для Ag-НЧ, синтезированных биологическим методом против *Setosphaeria turcica* составляла 170 мкг/мл (Khalil, El-Ghany and Couto, 2019).



**Рисунок 42** – Фунгицидная активность различных концентраций Ag-НЧ (5, 25, 50, 75 и 100 мкг/мл), полученных с использованием экстракта бородатых корней *P. ginseng*, в отношении грибов *Fusarium graminearum*, *F. poae*, *F. avenaceum* и *F. Sporotrichioides*.



**Рисунок 43** – Кривые роста *Fusarium graminearum* (А), *F. poae* (Б), *F. avenaceum* (В) и *F. sporotrichioides* (Г) в присутствии различных доз Ag-НЧ, полученных с использованием бородатых корней *P. ginseng*. Данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка.

В совокупности, наши результаты показывают, что различные виды *Fusarium*, вызывающие фузариоз пшеницы, чувствительны к Ag-НЧ, продуцируемым экстрактом

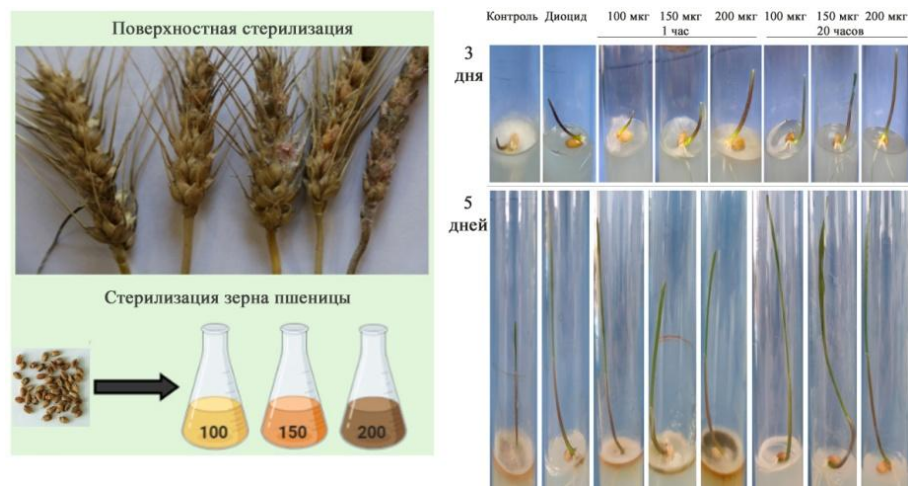
бородатого корня женьшеня, и доза 75 мкг/мл способна ингибировать их рост не менее, чем на 63%.

### 3.9.8. Стерилизация поверхности зерен пшеницы и их проращивание

Обработка фунгицидами до сих пор является наиболее популярным способом борьбы с инфекциями, передаваемыми через семена (Malyarenko and Ermakova, 2017). Однако вредное воздействие этих соединений на проростки пшеницы, развитие устойчивости у патогенов, а также токсичность и потенциальный риск для природы и людей от широкого использования фунгицидов способствует разработке новых и инновационных фунгицидов для сельского хозяйства.

Поскольку Ag-НЧ, продуцируемые экстрактом культуры бородатых корней женьшеня, продемонстрировали выраженный противогрибковый эффект против нескольких сопутствующих видов фузариоза, мы решили оценить их способность предотвращать развитие болезни посредством поверхностной стерилизации естественно инфицированных семян пшеницы. Для дезинфекции семена инкубировали в течение 1 или 20 часов с частицами в концентрации 100, 150 и 200 мкг/мл при непрерывном перемешивании в темноте. В качестве положительного контроля противогрибковой активности использовали 0,2% раствор диоцида. Необработанные семена использовали в качестве отрицательного контроля. Обработанные и необработанные семена помещали на среду для проращивания и инкубировали в течение 5 дней для выявления грибковой инфекции. Диоцид полностью подавлял рост грибов в обработанных проростках пшеницы, однако эти растения проявляли задержку прорастания семян. Необработанные семена демонстрировали высокий уровень грибковой инфекции на третий день культивирования, которая в дальнейшем прогрессировала и значительно снижала рост проростков пшеницы (Рисунок 44). Аналогичным образом, стерилизация наносеребром в течение 1 часа не оказала значительного противогрибкового эффекта через 5 дней, хотя и замедлила рост грибов в начале прорастания. Напротив, воздействие всех испытанных концентраций НЧ в течение 20 часов показало превосходные фунгицидные свойства, сравнимые с действием диоцида, без каких-либо заметных эффектов на прорастание проростков (Рисунок 44). Примечательно, что все изученные методы дезинфекции дали 100% всхожесть. Через семь дней проростки, обработанные в течение 20 часов Ag-НЧ или диоцидом, переносили в горшки с почвой и выращивали еще примерно два месяца. В течение всего периода наблюдений признаков слабости растений или изменений в развитии не отмечено, также, как и каких-либо заметных различий между растениями, обработанными Ag-НЧ и диоцидом. В соответствии с нашими наблюдениями, Nartop (Nartop, 2018) сообщил, что свежеприготовленные Ag-НЧ были на 100% эффективны для поверхностной стерилизации

семян растений из семейства Lamiaceae (*Salvia farinacea*, *Ocimum basilicum*, *Humus vulgaris*, *Ocimum basilicum* var. *Purpurascens*) без отрицательного воздействия на скорость прорастания. Аналогичные результаты были получены с использованием Ag-НЧ в концентрации 100 мкг/мл для поверхностной стерилизации эксплантатов *Prunus amygdalus*, что обеспечило 89% ингибирование контаминации (Nartop, 2018).



**Рисунок 44** – Противогрибковый эффект Ag-НЧ, полученных с использованием бородатых корней *P. ginseng* для поверхностной стерилизации семян пшеницы. Инфицированные семена инкубировали в течение 1 или 20 часов в водном растворе Ag-НЧ в концентрации 100, 150 или 200 мкг/мл при непрерывном встряхивании в темноте. Диоцид (0,2%) использовали в качестве положительного контроля эффективности стерилизации.

Грибы рода *Fusarium*, *Alternaria*, *Mucor*, *Aspergillus*, *Rhizopus* и *Curvularia* являются часто встречаемыми патогенами у различных сортов пшеницы (Tinti, 2015). Патогенная микофлора вызывает снижение жизнеспособности семян, урожайности, пищевой ценности и представляет серьезную проблему для сельского хозяйства. В частности, фузариоз колосьев является одним из наиболее распространенных и опасных заболеваний пшеницы во всем мире (Pathak and Zaidi, 2012). Наши результаты доказывают, что Ag-НЧ, полученные биотехнологическим способом, можно рассматривать как экологически чистое дезинфицирующее средство, которое можно использовать для борьбы с грибковыми заболеваниями сельскохозяйственных культур. В частности, наши результаты показывают, что биосинтезированные AgНЧ очень эффективны в качестве дешевого и биологически безопасного агента для полного устранения фузариоза колосьев пшеницы.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Скрининг биосинтетической активности клеточных культур растений показал, что наивысшим потенциалом обладают клеточные культуры воробейника и марены сердцелистной, тогда как каллусы женьшеня и арабидопсиса проявляли только следовую активность. Используя культуру воробейника в качестве модельной системы, мы изучили влияния ряда факторов на эффективность формирования НЧ. Было установлено, что использование высушенных клеточных культур при приготовлении экстракта и дальнейшее его кипячение способствуют более эффективному восстановлению иона-предшественника. Наиболее важным параметром в процессе восстановления оказалось освещение реакционной смеси, поскольку эффективность формирования Au-НЧ в темноте было значительно снижена, а в случае Ag-НЧ – полностью блокирована для большинства условий. Этот результат может указывать на необходимость фотоактивации биомолекул, определяющих восстановительный потенциал каллусов. Вероятнее всего такими молекулами являются низкомолекулярные соединения. Стоит отметить, что микроволновое излучение также оказывало положительный эффект на биосинтез НЧ с точки зрения скорости протекания реакции, тем не менее общая продуктивность процесса при таком способе воздействия была сопоставима с обычными условиями, а в случае синтеза Ag-НЧ даже ниже. Исследование скорости образования Ag-НЧ и Au-НЧ показало, что для полного завершения реакции восстановления требуется 5 часов. В случае синтеза биметаллических НЧ в различных соотношениях было выявлено, что полученные НЧ имели структуру ядро-облочка. Был проведен количественный анализ отдельных фракций биомолекул в экстракте *L. erythrorhizon*, содержание которых убывало в ряду полисахариды, белки, вторичные метаболиты, нуклеиновые кислоты, а также определено влияние отдельных фракций на эффективность продукции НЧ. Показано, что наивысшей способностью к формированию Ag-НЧ обладали фракции полисахаридов и вторичных метаболитов.

Проведенный анализ позволил получить новые данные о восстановительной способности отдельных биомолекул, представленных в экстракте клеточной культуры *L. erythrorhizon*. И хотя абсолютная активность вторичных метаболитов на порядок превышала активность всех других изученных фракций, с учетом их процентного содержания в экстракте воробейника, расчетный вклад полисахаридов в итоговую активность был выше почти в два раза. Поскольку восстановительные способности белков и низкомолекулярных соединений достаточно изучены, мы решили более подробно остановиться на изучении восстановительного потенциала отдельных очищенных растительных полисахаридов. В качестве таких соединений были использованы высокоочищенные и охарактеризованные полисахариды морских водорослей *S. cicharioides* и *F. evanescenes* – фукоидан, ламинаран и альгинат. Поскольку

данные классы полисахаридов обладают совершенно разными структурными характеристиками, их свойства, в том числе восстановительные в отношении формирования НЧ металлов, могут значительно различаться. Все изученные полисахариды обладали способностью быстро (в течение нескольких минут) восстанавливать ионы серебра с формированием НЧ. Биосинтетическая способность исследуемых полисахаридов убывала в ряду: альгинат, ламинаран, фукоидан. Размер частиц варьировал в пределах от 45 до 78 нм, величина их дзета-потенциала составляла от -28 до -32 мВ. Таким образом, мы впервые экспериментально показали, что полисахариды бурых водорослей могут быть использованы для быстрого получения Ag-НЧ. Низкую восстановительную активность ламинарана можно объяснить тем, что он является низкомолекулярным и незаряженным полисахаридом. В свою очередь, фукоиданы представлены сульфатированными, фукозосодержащими гетерополимерами средних размеров, в то время как альгинаты относятся к высокомолекулярным карбоксилированным гетерополимерам. Вследствие чего можно сделать вывод, что молекулярная масса и структурные характеристики влияют на восстановительные свойства полисахаридов.

Мы установили, что на продукцию НЧ влияют условия приготовления экстракта и физические параметры реакции. Однако дополнительные воздействия, такие как кипячение или микроволновое излучение, являются энергозатратными, что в свою очередь увеличивает стоимость производства наноструктур. С точки зрения биотехнологии наиболее рентабельным является подход, в котором клетки организма-продуцента обладают повышенными биосинтетическими показателями без применения дополнительных внешних воздействий. В случае с культивируемыми клетками растений, таких результатов можно добиться за счет генно-инженерной регуляции первичного или вторичного метаболизма. Действительно ранее мы показали, что гетерологичная экспрессия гена силикатеина A1 морской губки в каллусных клетках табака повышает изначально крайне низкий восстановительный потенциал культуры почти в 4 раза до уровня, сопоставимого с культурой *R. cordifolia*. Мы предположили, что регенированные из этих каллусов трансгенные растения табака также будут обладать повышенной способностью к формированию НЧ. Однако, экспериментальные данные показали, что растения табака, экспрессирующие ген силикатеина, обладали очень низким восстановительным потенциалом, по сравнению с клеточными культурами и не отличались в этом отношении от контрольных растений. Вероятно, данный феномен связан с различием в процентном соотношении рекомбинантного белка в клетке биообъекта: выше в каллусной культуре и ниже в целом растении.

Поскольку данные, полученные в данной работе, указывают на непосредственное участие вторичных метаболитов в процессе формирования биогенных НЧ, активация их

биосинтеза в клеточных культурах потенциально может приводить к увеличению восстановительного потенциала. Для проверки данного предположения, была использована модель клеточной культуры женьшеня – 1с восстановительный потенциал которой в ходе скрининга оказался одним из самых низких. В работе сравнивали активность контрольной клеточной культуры с *rolC*-трансгенной каллусной и корневой культурами. Установлено, что трансгенная корневая линия почти в 3 раза превосходила контрольные и *rolC*-трансгенные каллусные линии по продукции Ag-НЧ. При этом наблюдалась положительная корреляция с уровнем накопления гинзенозидов в гинзенозидов в клеточных линиях *P. ginseng*. Однако следует признать, что по всей видимости, активация биосинтетического потенциала *rolC*-корней была связана не только с индукцией вторичного метаболизма, т.к. двукратное увеличение содержания гинзенозидов в *rolC*-каллусах не привело к ожидаемой активации восстановительного потенциала. Следовательно, высокая активность корней ассоциирована и с другими изменениями в биохимических процессах трансгенной клетки, имеющих положительное влияние на формирование НЧ. Вероятно, что таким изменением является общая активация биосинтеза белков и полисахаридов, связанная с необходимостью поддержания дифференцированного состояния культуры.

В ходе работы были проведены биоиспытания полученных с помощью клеточных культур биогенных монометаллических и биметаллических НЧ, направленные на выявление перспективных для практического использования цитотоксических, антибактериальных, фунгицидных и элиситорных свойств. Наши результаты показали, что НЧ, полученные с помощью клеточных культур растений, обладают выраженным цитотоксическим действием, но при этом не оказывают существенного влияния на миграцию клеток *in vitro*. Биогенные НЧ проявляли выраженные биоцидные свойства в отношении патогенных бактерий животных и растений. Была обнаружена способность Ag-НЧ активировать биосинтез вторичных метаболитов в культивируемых клетках растений, выступая в качестве элиситоров продукции ценных биологически активных веществ. Выявлены фунгицидные свойства биогенных Ag-НЧ в отношении нескольких возбудителей фузариоза пшеницы, включая *Fusarium graminearum*, *F. avenaceum*, *F. poae* и *F. sporotrichioides*. В совокупности, полученные нами данные, создают предпосылки для продолжения исследований свойств биогенных НЧ металлов, представляющих интерес для медицины в качестве кандидатов для биосовместимых антисептических и противоопухолевых терапевтических препаратов. Данные частицы представляют интерес и для биотехнологии с целью их использования в качестве обеззараживающих средств и элиситоров вторичного метаболизма широкого спектра действия.

Таким образом, мы показали, что клеточные культуры являются перспективным альтернативным источником биомолекул с высоким потенциалом в отношении биосинтеза НЧ металлов. Продукция НЧ с использованием экстракта клеточной культуры воробейника значительно превышает многие описанные в литературе методы и может быть использована в бионанотехнологии. Отличительной особенностью описанного биологического подхода является возможность использования для синтеза НЧ побочных продуктов биотехнологического производства, например, клеточного дебриса после экстракции целевого продукта, отдельных примесных фракций, образующихся при технологическом процессе или компонентов отработанных питательных сред. Нами впервые показана возможность увеличения эффективности фитосинтеза и изменения их физико-химических и биологических свойств с помощью методов генетической инженерии.

## ВЫВОДЫ

1. Экстракт каллусной культуры *L. erythrorhizon* с высокой эффективностью индуцирует процесс экзогенного формирования отрицательно заряженных монометаллических и биметаллических Ag/Au-НЧ. Наиболее важным фактором для данного процесса является освещение реакционной смеси.

2. На примере каллусной культуры воробейника впервые экспериментально показано, что отдельные фракции экстракта вносят различный вклад в эффективность формирования НЧ. Восстановительный потенциал биомолекул увеличивается в ряду: нуклеиновые кислоты, белки, полисахариды и вторичные метаболиты – производные кофейной кислоты.

3. Высокоочищенные индивидуальные полисахариды морских водорослей *S. cicharioides* и *F. evanescens*, такие как фукоидан, ламинаран и альгинат, проявляют способность к синтезу монодисперсных Ag-НЧ с высокой биологической активностью. Восстановительный потенциал альгината превосходил другие изученные полисахариды более чем в 3 раза.

4. Сверхэкспрессия гена силикатеина значительно повышает восстановительный потенциал каллусных культур в отношении биосинтеза Ag-НЧ, однако эта особенность отсутствует у трансгенных растений. Установлено, что полученные НЧ, способны эффективно подавлять рост бактериальных патогенов животных и растений *E. coli* и *A. tumefaciens*.

5. Активация биосинтеза гинзенозидов в *rolC*-трансгенных корневых культурах женьшеня способствует пропорциональному увеличению продукции Ag-НЧ, что подтверждает участие вторичных метаболитов в их биосинтезе.

6. НЧ, полученные с помощью клеточных культур растений обладают выраженным цитотоксическим действием в отношении клеток глиомы С6 крысы, нейробластомы N2A и эмбриональных фибробластов 3Т3 мыши. Наибольшая степень цитотоксичности отмечена для серебряных монометаллических частиц, а также для биметаллических частиц с большей пропорцией атомов серебра.

7. Ag-НЧ и нитрат серебра значительно активируют накопление вторичных метаболитов в каллусных культурах *C. cardunculus*, *V. vinifera* и *A. thaliana*. При этом эффект данных элиситоров варьировал для разных групп вторичных метаболитов и был равным в случае кафеилхинных кислот и стильбенов, тогда как НЧ оказались более эффективны для стимуляции накопления индольных глюкозинолатов.

8. Ag-НЧ биогенного происхождения ингибировали рост различных видов патогенных грибов-возбудителей фузариоза пшеницы. На основе полученных данных нами разработан способ стерилизации естественно инфицированных семян пшеницы, при котором поверхностная обработка семян раствором Ag-НЧ, в течение 20 часов приводит к полной элиминации инфекции, не оказывая влияния на всхожесть семян и жизнеспособность растений.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Abd El-Aziz A.R.M. et al. Biosynthesis of silver nanoparticles using *Fusarium solani* and its impact on grain borne fungi // Dig. J. Nanomater. Biostruct. 2015. V. 10. P. 655–662.
2. Abdallah Y. et al. Green synthesis of MgO nano-flowers using *Rosmarinus officinalis* L. (Rosemary) and the antibacterial Activities against *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* // BioMed Res. Int. 2019. V. 2019. P. 5620989.
3. AbdelHamid A.A. et al. Phytosynthesis of Au, Ag, and AuAg bimetallic nanoparticles using aqueous extract of *Sago pondweed* (*Potamogeton pectinatus*) // ACS Sustain. Chem. Eng. 2013. V. 12, No 1. P. 1520–1529.
4. Abdel-Raouf N. et al. Biosynthesis of silver nanoparticles by using of the marine brown alga *Padina pavonia* and their characterization // Saudi J. Biol. Sci. 2019. V. 26, No 6. P. 1207–1215.
5. Abdel-Raouf N., Al-Enazi N.M., Ibraheem I.B. Green biosynthesis of gold nanoparticles using *Galaxaura elongata* and characterization of their antibacterial activity // Arab. J. Chem. 2017. V. 10, No Suppl. 2. P. S3029–S3039.
6. Abdi G., Salehi H., Khosh-Khui M. Nano silver: a novel nanomaterial for removal of bacterial contaminants in valerian (*Valeriana officinalis* L.) tissue culture // Acta Physiol. Plant. 2008. V. 30, No 5. P. 709–714.
7. Abid J.P. et al. Preparation of silver nanoparticles in solution from a silver salt by laser irradiation // Chemical Communications. 2002. V. 7. P. 792–793.
8. Agata I. et al. Rabdosiin, a new rosmarinic acid dimer with a lignan skeleton, from *Rabdosia japonica* // Chem. Pharm. Bull. 1988. V. 36, P. 3223–3225.
9. Aghdaei M., Salehi H., Sarmast M. Effects of silver nanoparticles on *Tecomella undulate* (Roxh.) seem. micropropagation. Adv Horti Sci. 2012. V. 26, 1. P. 21–24.
10. Ahmad A. et al. Phytosynthesis and antileishmanial activity of gold nanoparticles by *Maytenus Royleanus* // J. Food Biochem. 2016. V. 40. P. 420–427.
11. Ahmadi F. et al. Effect of silver nanoparticles on common bacteria in hospital surfaces // Jundishapur J. Microbiol. 2013. V. 6, No 3. P. 209–214.
12. Ahmed S. et al. A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: a green expertise // J. Adv. Res. 2016. V. 7, No 1. P. 17–28.
13. Ahmed T. et al. Silver nanoparticles synthesized by using *Bacillus cereus* SZT1 ameliorated the damage of bacterial leaf blight pathogen in rice // Pathogens. 2020 V. 9, No3. P. 160.
14. Ahn B.Y. et al. Omnidirectional printing of flexible, stretchable, and spanning silver microelectrodes // Science. 2009. V. 23, No 5921. P. 1590–1593.
15. Akther T., Hemalatha S. Mycosilver nanoparticles: synthesis, characterization and its efficacy against plant pathogenic fungi // BioNanoScience. 2019. V. 9. P. 296–301.
16. Alavi M. et al. Antibacterial, antibiofilm, anti-quorum sensing, antimotility, and antioxidant activities of green fabricated Ag, Cu, TiO<sub>2</sub>, ZnO, and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs via *Protoparmeliopsis muralis* lichen aqueous extract against multi-drug-resistant bacteria // ACS Biomater. Sci. Eng. 2019. V. 9, No 5. P. 4228–4243.

17. Almaary K.S. et al. Complete green synthesis of silver nanoparticles applying seed-borne *Penicillium duclauxii* // Saudi J. Biol. Sci. 2020. V. 27, No 5. P. 133–1339.
18. Al-Shalabi Z., Doran P.M., Metal uptake and nanoparticle synthesis in hairy root cultures // Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 2013. V. 134. P. 135–153.
19. Alves R. et al. Detection of Ara h 1 (a major peanut allergen) in food using an electrochemical gold nanoparticle-coated screen-printed immunosensor // Biosens. Bioelectron. 2015. V. 64, No 19. P. 19–24.
20. Al-Zubaidi S., Alayafi A.A., Abdelkader H.S. Biosynthesis, characterization and antifungal activity of silver nanoparticles by *Aspergillus niger* isolate // J. Nanotechnol. Res. 2019. V. 1, No 1. P. 23–36.
21. Ameen F. et al. Fabrication of silver nanoparticles employing the cyanobacterium *Spirulina platensis* and its bactericidal effect against opportunistic nosocomial pathogens of the respiratory tract // J. Mol. Struct. 2020. V. 1217. P. 128392.
22. Amemiya Y. et al. Controlled formation of magnetite crystal by partial oxidation of ferrous hydroxide in the presence of recombinant magnetotactic bacterial protein Mms6 // Biomaterials. 2007. V. 28. P. 5381–5389.
23. Amin M. et al. Green synthesis of silver nanoparticles through reduction with *Solanum xanthocarpum* L. berry extract: characterization, antimicrobial and urease inhibitory activities against *Helicobacter pylori* // Int. J. Mol. Sci. 2012. V. 13. P. 9923–9941.
24. Anastas P.T., Warner, J.C. Green Chemistry: Theory and Practice. // New York: Oxford University Press. 1998. P. 30.
25. Anjum S., Abbasi B.H. Thidiazuron-enhanced biosynthesis and antimicrobial efficacy of silver nanoparticles via improving phytochemical reducing potential in callus culture of *Linum usitatissimum* L // Int. J. Nanomed. 2016. V. 11. P. 715–728.
26. Ankamwar B. Biosynthesis of gold and silver nanoparticles using *Emblica officinalis* fruit extract, their phase transfer and transmetallation in an organic solution // Journal of nanoscience and nanotechnology. 2005. V. 5, No 10. P. 1665–1671.
27. Annadhasan M., Kasthuri J. Rajendiran N. Green synthesis of gold nanoparticles under sunlight irradiation and their colorimetric detection of Ni<sup>2+</sup> and Co<sup>2+</sup> ions // RSC Adv. 2015 V. 5. P. 11458–11468.
28. Anu M.E., Saravanakumar M.P. A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application // IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng. 2017. V. 263. P. 032019.
29. Apte M. et al. Psychrotrophic yeast *Yarrowia lipolytica* NCYC 789 mediates the synthesis of antimicrobial silver nanoparticles via cell-associated melanin // AMB Express. 2013. V. 3, No 1. P. 32.
30. Arab M.M. et al. Effects of antimicrobial activity of silver nanoparticles on *in vitro* establishment of G × N15 (hybrid of almond × peach) rootstock // J. Genet. Eng. Biotechnol. 2014. V. 12, No 2. P. 103–110.
31. Arsiya F., Sayadi M.H., Sobhani S. Green synthesis of palladium nanoparticles using *Chlorella vulgaris* // Mater. Lett. 2017. V. 186. P. 113–115.
32. Arya A. et al. Biogenic synthesis of copper and silver nanoparticles using green alga *Botryococcus braunii* and its antimicrobial activity // Bioinorg. Chem. Appl. 2018. P. 7879403.

33. Ashraf M.A.E. et al. Assessment of genetic variability and yield stability in chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars in river Nile state, Sudan // J. Plant Breed. Crop Sci. 2015. V. 7, No 7. P. 219–225.
34. Asiani K.R. et al. SilE is an intrinsically disordered periplasmic “molecular sponge” involved in bacterial silver resistance // Mol Microbiol. 2016. V. 101. P. 731–742.
35. Aslam B. et al. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis // Infection and Drug Resistance. 2018. V. 11. P. 1645–1658.
36. Asmathunisha N., Kathiresan K. A review on biosynthesis of nanoparticles by marine organisms // Coll. Surf. B: Bionterf. 2013. V. 103. P. 283–287.
37. Ataie A., Mali A. Characteristics of barium hexaferrite nanocrystalline powders prepared by a sol-gel combustion method using inorganic agent // J. Electroceram. 2008. V. 21, No 1. P. 357–360.
38. Ayala-Núñez N.V. et al. Silver nanoparticles toxicity and bactericidal effect against methicillinresistant *Staphylococcus aureus*: nanoscale does matter // Nanobiotechnology. 2009. V. 5, No 4. P. 2–9.
39. Ayaz A.K.B. et al. Preparation of gold nanoparticles using *Salicornia brachiata* plant extract and evaluation of catalytic and antibacterial activity // Spectrochim. Acta. 2014. V. 130. P. 54–58.
40. Bahrulolum H. et al. Green synthesis of metal nanoparticles using microorganisms and their application in the agrifood sector // J Nanobiotechnol. 2021. V. 19, No 1. P. 86.
41. Bai H.J. et al. Biosynthesis of cadmium sulfide nanoparticles by photosynthetic bacteria *Rhodospseudomonas palustris* // Colloids Surf. B Biointerf. 2009. V. 70. P. 142–146.
42. Balabanova L.A. et al. Development of host strains and vector system for an efficient genetic transformation of filamentous fungi // Plasmid. 2019. V.101. P.1–9.
43. Balakumaran M.D., Ramachandran R., Kalaichelvan P.T. Exploitation of endophytic fungus, *Guignardia mangiferae* for extracellular synthesis of silver nanoparticles and their in vitro biological activities // Microbiol. Res. 2015. V. 178. P. 9–17.
44. Balamaniandan T., Balaj, S., Pandiarajan J. Biological synthesis of silver nanoparticles by using onion (*Allium cepa*) extract and their antibacterial and antifungal activity // World Appl. Sci. J. 2015. V. 33. P. 939–943.
45. Ballottin D. et al. Elucidating protein involvement in the stabilization of the biogenic silver nanoparticles // Nanoscale Res. Lett. 2016. V. 11. P. 313.
46. Bansal V. et al. Biosynthesis of zirconia nanoparticles using the fungus *Fusarium oxysporum* // J. Mater. Chem. 2004. V. 14. P. 3303–3305.
47. Bansal V. et al. Fungus-mediated biosynthesis of silica and titania particles // J. Mater. Chem. 2005. V. 15. P. 2583–2589.
48. Bao Z., Lan C.Q. Mechanism of light-dependent biosynthesis of silver nanoparticles mediated by cell extract of *Neochloris oleoabundans* // Colloids Surf. B. 2018. V. 170. P. 251–257.
49. Bassetto C.V. et al. Flash light synthesis of noble metal nanoparticles for electrochemical applications: silver, gold, and their alloys // J. Solid State Electrochem. 2020. V. 24, No 8. P. 1781–1788.

50. Begum N.A. et al. Biogenic synthesis of Au and Ag nanoparticles using aqueous solutions of Black Tea leaf extracts // *Colloids Surf. B Biointerfaces*. 2009. V. 71, No 1. P. 113–118.
51. Bhardwaj K. et al. Conifer-derived metallic nanoparticles: green synthesis and biological applications // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21, No 23. P. 9028.
52. Bhardwaja A.K. et al. Direct sunlight enabled photo-biochemical synthesis of silver nanoparticles and their bactericidal efficacy: photon energy as key for size and distribution control // *J. Photochem. Photobiol. B*. 2018. V. 188. P. 42–49.
53. Bhargava A. et al. Utilizing metal tolerance potential of soil fungus for efficient synthesis of gold nanoparticles with superior catalytic activity for degradation of rhodamine B // *J. Environ. Manag.* 2016. V. 183. P. 22–32.
54. Bhattacharjee S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? // *J. Control Release*. 2016. V. 235. P. 337–351.
55. Bonoiu A.C. et al. Nanotechnology approach for drug addiction therapy: gene silencing using delivery of gold nanorod-siRNA nanoplex in dopaminergic neurons // *PNAS*. 2009. V. 106, No 14. P. 5546–5550.
56. Botcha S., Prattipati S.D. Callus extract mediated green synthesis of silver nanoparticles, their characterization and cytotoxicity evaluation against MDA-MB-231 and PC-3 cells // *BioNanoScience*. 2020. V. 10. P. 11–22.
57. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* 1976. V. 72. P. 248–254.
58. Braydich-Stolle L. et al. *In vitro* cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells // *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology*. 2005. V. 88, No 2. P. 412–419.
59. Brayner R. et al. Cyanobacteria as bioreactors for the synthesis of Au, Ag, Pd, and Pt nanoparticles via an enzyme-mediated route // *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2007. V. 7, No 8. P. 2696–2708.
60. Brooks R.R. et al. Phytomining // *Trends Plant Sci.* 1998. V. 3, No 9. P. 359–362.
61. Bulgakov V.P. et al. Effect of salicylic acid, methyl jasmonate, ethephon and cantharidin on anthraquinone production by *Rubia cordifolia* callus cultures transformed with the *rolB* and *rolC* genes // *J. Biotechnol.* 2002. V. 97, No 3. P. 213–221.
62. Bulgakov V.P. et al. Shikonin production by P-Fluorophenylalanine resistant cells of *Lithospermum erythrorhizon* // *Fitoterapia*. 2001. V. 72. P. 394–401.
63. Bulgakov V.P. et al. The impact of plant *rolC* oncogene on ginsenoside production by ginseng hairy root cultures // *Phytochemistry*. 1998. V. 49. P. 1929–1934.
64. Bulgakov V.P. et al. The *rolB* gene suppresses reactive oxygen species in transformed plant cells through the sustained activation of antioxidant defense // *Plant Physiol.* 2012. V. 158, No 3. P. 1371–1381.
65. Burkitt S. et al. Label-free visualization and tracking of gold nanoparticles in vasculature using multiphoton luminescence // *Nanomaterials*. 2020. V. 10, No 11. P. 2239.
66. Carlson C. et al. Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species // *J. Phys. Chem. B*. 2008. V. 112. P. 13608–13619.

67. Carvalho M.R., Reis R.L., Oliveira J.M. Dendrimer nanoparticles for colorectal cancer applications // *J. Mater. Chem. B*. 2020. V. 8. P. 1128–1138.
68. Chakraborty I. et al. Protein-mediated shape control of silver nanoparticles // *Bioconjug. Chem.* 2018. V. 29. P. 1261–1265.
69. Chakraborty I., Parak W.J. Protein-induced shape control of noble metal nanoparticles // *Adv. Mat. Inter.* 2019. V. 6. P. 1801407.
70. Chan W.C.W. Bionanotechnology progress and advances // *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2006. V. 12, No 1. P. 87–91.
71. Chandran S.P. et al. Synthesis of gold nanotriangles and silver nanoparticles using *Aloe vera* plant extract // *Biotechnol. Prog.* 2006. V. 22, No 2. P. 577–583.
72. Chatterjee S. et al. Biofabrication of iron oxide nanoparticles using manglicolous fungus *Aspergillus niger* BSC-1 and removal of Cr(VI) from aqueous solution // *Chem. Eng. J.* 2020. V. 385. P. 123790.
73. Chauhan R., Kumar A., Abraham J. A biological approach to the synthesis of silver nanoparticles with *Streptomyces sp* JAR1 and its antimicrobial activity // *Sci. Pharm.* 2013. V. 81. P. 607–624.
74. Chen W. et al. Ginseng: a bibliometric analysis of 40-year journey of global clinical trials // *J. Adv. Res.* 2020.
75. Cheng P. et al. Synthesis of silver nanoparticles by X-ray irradiation in acetic water solution containing chitosan // *Radiat. Phys. Chem.* 2007. V. 76, No 7. P. 1165–1168.
76. Cho E.J. et al. Nanoparticle characterization: state of the art, challenges, and emerging technologies // *Molecular pharmaceuticals*. 2013. V. 10, No 6. P. 2093–2110.
77. Conde J., Doria G., Baptista P. Noble metal nanoparticles applications in cancer // *J. Drug Deliv.* 2012. P. 1–12.
78. Crane R.A. et al. Magnetite and zero-valent iron nanoparticles for the remediation of uranium contaminated environmental water // *Water Res.* 2011. V. 45. P. 2931–2942.
79. Cui Y. et al. Synthesis of Ag core-Au shell bimetallic nanoparticles for immunoassay based on surface-enhanced Raman spectroscopy // *J. Phys. Chem. B*. 2006. V. 110, No 1. P. 4002–4006.
80. Cui Y. et al. The molecular mechanism of action of bactericidal gold nanoparticles on *Escherichia coli* // *Biomaterials*. 2012. V. 33. P. 2327–2333.
81. Daduang J. et al. Gallic acid conjugated with gold nanoparticles: antibacterial activity and mechanism of action on foodborne pathogens // *Int. J. Nanomedicine*. 2016. V. 11. P. 3347–3356.
82. Dahl J. A., Maddux B.L.S., Hutchison J.E. Toward greener nanosynthesis // *Chem. Rev.* 2007. V. 107, No 6 P. 2228–2269.
83. Dameron C.T. et al. Biosynthesis of cadmium sulphide quantum semiconductor crystallites // *Nature*. 1989. V. 338. P. 596–597.
84. Danaei M. et al. Green synthesis of silver nanoparticles (AgNPs) by filamentous algae extract: comprehensive evaluation of antimicrobial and anti-biofilm effects against nosocomial pathogens // *Biologia*. 2021. V. 76. P. 3057–3069.

85. Das J., Das M.P., Velusamy P. *Sesbania grandiflora* leaf extract mediated green synthesis of antibacterial silver nanoparticles against selected human pathogens // Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc. 2013. V. 104. P. 265–270.
86. De Aragão A.P. et al. Green synthesis of silver nanoparticles using the seaweed *Gracilaria birdiae* and their antibacterial activity // Arab. J. Chem. 2016. V. 12, No 8. P. 4182–4188.
87. Deepak V. et al. Synthesis of gold and silver nanoparticles using purified URAK // Colloids Surf. B. 2011. V. 86, No 2. P. 353–358.
88. Demetzos C. Application of nanotechnology in drug delivery and targeting // Pharmaceutical Nanotechnology. 2016. V. 13. P. 77–145.
89. DeSimone J.M. Practical approaches to green solvents // Science. 2002. V. 297, No 5582. P. 799–803.
90. Ding C. et al. Novel fungus-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> bio-nanocomposites as high performance adsorbents for the removal of radionuclides // J. Hazard. Mater. 2015. V. 295. P. 127–137.
91. Dodgson K. Determination of inorganic sulphate in studies on the enzymic and non-enzymic hydrolysis of carbohydrate and other sulphate esters // Biochem. J. 1961. V. 78. P. 312–319.
92. Dreaden, E.C. et al. The golden age: gold nanoparticles for biomedicine // Chem. Soc. Rev. 2012. V. 41, No 7. P. 2740–2779.
93. Dror-Ehre A. et al. Silver nanoparticles - *E. coli* colloidal interaction in water and their effect on *E. coli* survival // J. Colloid Interface Sci. 2009. V. 339, No 2. P. 521–526.
94. Dubey S.P. et al. Bioprospective of *Sorbus aucuparia* leaf extract in development of silver and gold nanocolloids // Colloid Surf. B. 2010. V. 80, No 1. P. 26–33.
95. Dubois M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances // Anal. Chem. 1956. V. 28. P. 350–356.
96. Dultseva G.G. et al. Analysis of the surface functional groups of organic nanoparticles formed in furfural vapour photonucleation using a rupture event scanning technique // Anal. Methods. 2017. V. 9, No 36. P. 5348–5355.
97. El Domany E.B. et al. Biosynthesis physico-chemical optimization of gold nanoparticles as anti-cancer and synergetic antimicrobial activity using *Pleurotus ostreatus* fungus // J. Appl. Pharm. Sci. 2018. V. 8. P. 119–128.
98. Elamawi R.M., Al-Harbi R.E., Hendi A.A. Biosynthesis and characterization of silver nanoparticles using *Trichoderma longibrachiatum* and their effect on phytopathogenic fungi // Egypt. J. Biol. Pest Control. 2018. V. 28, No 1.
99. Elangovan K. et al. Phyto mediated biogenic synthesis of silver nanoparticles using leaf extract of *Andrographis echinoides* and its bio-efficacy on anticancer and antibacterial activities // J. Photochem. Photobiol. B. 2015. V. 151. P. 118–124.
100. Elbeshehy E.K.F., Elazzazy A.M., Aggelis G. Silver nanoparticles synthesis mediated by new isolates of *Bacillus spp.*; nanoparticle characterization and their activity against bean yellow mosaic virus and human pathogens // Front. Microbiol. 2015. V. 6. P. 453.
101. Elfick A. et al. Biosynthesis of magnetic nanoparticles by human mesenchymal stem cells following transfection with themagnetotactic bacterial gene *mms6* // Sci Rep. 2017. V. 7. P. 39755.

102. Elgorban A.M. et al. Extracellular synthesis of silver nanoparticles using *Aspergillus versicolor* and evaluation of their activity on plant pathogenic fungi // *Mycosphere* 2016. V. 7. P. 844–852.
103. El-Moslamy S.H. et al. Applying Taguchi design and large-scale strategy for mycosynthesis of nano-silver from endophytic *Trichoderma harzianum* SYA.F4 and its application against phytopathogens // *Sci. Rep.* 2017. V. 28, No 7. P. 45297.
104. Etame A.B. et al. Design and potential application of PEGylated gold nanoparticles with size-dependent permeation through brain microvasculature // *Nanomed.: Nanotechnol. Biol. Med.* 2011. V. 7, No 6. P. 992–1000.
105. Fakhrfeshani M., Bagheri A., Sharifi A. Disinfecting effects of nano silver fluids in gerbera (*Gerbera jamesonii*) capitulum tissue culture // *J. Biol. Environ. Sci.* 2012. V. 6, No 17. P. 121–127.
106. Fatima K. et al. Induction of secondary metabolites on nanoparticles stress in callus culture of *Artemisia annua* L. // *Braz. Arch. Biol. Technol.* 2020. V. 8, No 2.
107. Fatima R. et al. Biosynthesis of silver nanoparticles using red algae *Portieria hornemannii* and its antibacterial activity against fish pathogens // *Microb. Pathog.* 2020. V. 138. P. 103780.
108. Fazal H. et al. Elicitation of medicinally important antioxidant secondary metabolites with silver and gold nanoparticles in callus cultures of *Prunella vulgaris* L // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2016. V. 180, No 6. P. 1076–1092.
109. Femi-Adepoju A.G. et al. Green synthesis of silver nanoparticles using terrestrial fern (*Gleichenia pectinata* (Willd.) C. Presl.): characterization and antimicrobial studies // *Heliyon.* 2019. V. 5. P. e01543.
110. Ferdous Z., Nemmar A. Health impact of silver nanoparticles: a review of the biodistribution and toxicity following various routes of exposure // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21, No 7. P. 2375.
111. Figueiredo E.P. et al. New approach for simvastatin as an antibacterial: synergistic effect with bio-synthesized silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria // *Int. J. Nanomed.* 2019. V. 14, No 3. P. 7975–7985.
112. Filip G.A. et al. UV-light mediated green synthesis of silver and gold nanoparticles using Cornelian cherry fruit extract and their comparative effects in experimental inflammation // *J. Photochem. Photobiol. B.* 2019. V. 191 P. 26–37.
113. Filipe V., Hawe A., Jiskoot W. Critical evaluation of nanoparticle tracking analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates // *Pharmaceutical Research.* 2010. V. 27, No 5. P. 796–810.
114. Foldbjerg R., Dang D., Autrup H. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in the human lung cancer cell line, A549 // *Arch. Toxicol.* 2011. V. 85. P. 743–750.
115. Franci G. et al. Silver nanoparticles as potential antibacterial agents // *Molecules.* 2015. V. 20. P. 8856–8874.
116. Frattini A. et al. Effect of amine groups in the synthesis of Ag nanoparticles using aminosilanes // *Mater. Chem. Phys.* 2005. V. 94, No. P1. 148–152.
117. Fu Y., Li J., Li J. Metal/semiconductor nanocomposites for photocatalysis: fundamentals, structures, applications and properties // *Nanomaterials.* 2019. V. 9, No 3. P. 359.
118. Gardea-Torresdey J.L. et al. Alfalfa sprouts: a natural source for the synthesis of silver nanoparticles // *Langmuir.* 2003. V. 19, No 5. P. 1357–1361.

119. Gardea-Torresdey J.L. et al. Formation and growth of Au nanoparticles inside live alfalfa plants // *Nano Lett.* 2002. V. 2, No 4. P. 397–401.
120. Gardea-Torresdey J.L. et al. Gold nanoparticles obtained by bio-precipitation from gold (III) solutions // *J. Nanopart. Res.* 1999. V. 1, No 3. P. 397–404.
121. Gencoglu A., Minerick A.R. Electrochemical detection techniques in micro- and nanofluidic devices // *Microfluid. Nanofluid.* 2014. V. 17, No 5. P. 781–807.
122. Gharegozloo S. et al. High performance Ni–CNTs catalyst: synthesis and characterization // *RSC Adv.* 2016. V. 52, No 6. P. 47072–47082.
123. Ghasemi B., Hosseini R., Nayeri D.F. Effects of cobalt nanoparticles on artemisinin production and gene expression in *Artemisia annua* // *Turk J Botany.* 2015. V. 39. P. 769–777.
124. Gibson J.D., Khanal, B.P., Zubarev E.R. Paclitaxel-functionalized gold nanoparticles // *J. Am. Chem. Soc.* 2007. V. 129, No 37. P. 11653–11661.
125. Gondil V.S. et al. Antibiofilm potential of *Sea buckthorn* silver nanoparticles (SBT@AgNPs) against *Pseudomonas aeruginosa* // *3 Biotech.* 2019. V. 9, No 11.
126. González-Ballesteros N. et al. Green synthesis of gold nanoparticles using brown algae *Cystoseira baccata*: its activity in colon cancer cells // *Colloids Surf. B.* 2017. V. 153. P. 190–198.
127. Gopinath V., Velusamy P. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using *Bacillus sp.* GP-23 and evaluation of their antifungal activity towards *Fusarium oxysporum* // *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2013. V. 106. P. 170–174.
128. Gould I.M. Antibiotic resistance: the perfect storm // *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2009. V. 34, No suppl 3. P. S2–S5.
129. Gouran A. et al. Effect of silver nanoparticles on grapevine leaf explants sterilization at *in vitro* conditions // 2nd National Conference on Nanotechnology from Theory to Application. 2014. P. 1–6.
130. Govarthanan M. et al. Low-cost and eco-friendly synthesis of silver nanoparticles using coconut (*Cocos nucifera*) oil cake extract and its antibacterial activity // *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* 2016 V. 44 P. 1878–1882.
131. Guilger M. et al. Biogenic silver nanoparticles based on *Trichoderma harzianum*: synthesis, characterization, toxicity evaluation and biological activity // *Sci. Rep.* 2017. V. 7, No 1. P. 44421.
132. Guo P. The emerging field of RNA nanotechnology // *Nat. Nanotechnol.* 2010. V. 12, No 5. P. 833–842.
133. Gurunathan S., Zhang X.-F. Combination of salinomycin and silver nanoparticles enhances apoptosis and autophagy in human ovarian cancer cells: an effective anticancer therapy // *Int. J. Nanomedicine.* 2016. V. 11. P. 3655–3675.
134. Hamida R.S. et al. Cyanobacteria – a promising platform in green nanotechnology: a review on nanoparticles fabrication and their prospective applications // *Int. J. Nanomedicine.* 2020. V. 15. P. 6033–6066.
135. Haroon B.H. et al. Green synthesis of silver nanoparticles using *Hybanthus enneaspermus* plant extract against nosocomial pathogens with nanofinished antimicrobial cotton fabric // *Glob J Nano.* 2016. V. 1, No 1. P. 555554.

136. Hartono D., Hody Y.K.L., Yung L.Y. The effect of cholesterol on protein-coated gold nanoparticle binding to liquid crystal-supported models of cell membranes // *Biomaterials*. 2010. V.31, No 11. P. 3008–3015.
137. Hassabo A.G. et al. Impregnation of silver nanoparticles into polysaccharide substrates and their properties // *Carbohydr. Polym.* 2015. V. 122. P. 343–350.
138. Hassan A.A. Antimicrobial potential of iron oxide nanoparticles in control of some causes of microbial skin affection in cattle // *Eur. J. Acad. Essays*. 2015. V. 2, No 6. P. 20–31.
139. Hassan S.E. et al. Endophytic actinomycetes *Streptomyces spp* mediated biosynthesis of copper oxide nanoparticles as a promising tool for biotechnological applications // *J. Biol. Inorg. Chem.* 2019. V. 24. P. 377–393.
140. Hassan S.E. et al. New approach for antimicrobial activity and bio-control of various pathogens by biosynthesized copper nanoparticles using endophytic actinomycetes // *J. Radiat. Res. Appl. Sci.* 2018. V. 11. P. 262–270.
141. Hodaei A., Ataie A., Mostafavi E. Intermediate milling energy optimization to enhance the characteristics of barium hexaferrite magnetic nanoparticles // *J. Alloys Compd.* 2015. V. 640. P. 162–168.
142. Hong W., Tai N. Investigations on the thermal conductivity of composites reinforced with carbon nanotubes // *Diam. Relat. Mater.* 2008. V. 17, No 7. P. 1577–1581.
143. Hossain A. et al. Green synthesis of silver nanoparticles with culture supernatant of a bacterium *Pseudomonas rhodesiae* and their antibacterial activity against soft rot pathogen *Dickeya dadantii* // *Molecules*. 2019. V. 24, No 12. P. 2303.
144. Hossain M.M. et al. Investigation of the antibacterial activity and *in vivo* cytotoxicity of biogenic silver nanoparticles as potent therapeutics // *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2019. V. 7. P. 239.
145. Howorka S., Siwy Z. Nanopore analytics: sensing of single molecules // *Chem. Soc. Rev.* 2009. V. 38, No 8. P. 2360–2384.
146. Huang J. et al. Biosynthesis of silver and gold nanoparticles by novel sundried *Cinnamomum camphora* leaf // *Nanotechnology*. 2007. V. 18, No 10. P. 105104–105114.
147. Huang W. et al. Synergistic antifungal activity of green synthesized silver nanoparticles and epoxiconazole against *Setosphaeria turcica* // *J. Nanomater.* 2020. P. 1–7.
148. Humberto H.L. et al. Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2010. V. 26, No 4. P. 615–621.
149. Hussain M.S. et al. Current approaches toward production of secondary plant metabolites // *J. Pharm. Bioallied. Sci.* 2012. V. 4, No 1. P. 10–20.
150. Hussain S.M. et al. *In vitro* toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells // *Toxicol. in Vitro*. 2005. V. 19, No 7. P. 975–983.
151. Hutchison J.E. Green nanoscience: a proactive approach to advancing applications and reducing implications of nanotechnology // *ACS Nano*. 2008. V. 2, No 3. P. 395–402.
152. Ibrahim E. et al. Green-synthesization of silver nanoparticles using endophytic bacteria isolated from garlic and its antifungal activity against wheat *Fusarium* head blight pathogen *Fusarium graminearum* // *Nanomaterials (Basel)*. 2020. V. 10, No 2. P. 219.

153. Iqbal M. et al. Effect of semiarid environment on some nutritional and antinutritional attributes of calendula (*Calendula officinalis*) // J. Chem. 2015. V. 2015. P. 1–8.
154. Ismail E.H. et al. Successful green synthesis of gold nanoparticles using a *Corchorus olitorius* extract and their antiproliferative effect in cancer cells // Int. J. Mol. Sci. 2018. V. 19. P. 2612.
155. Iyer R.I., Panda T. Biosynthesis of gold and silver nanoparticles with anti-microbial activity by callus cultures of *Michelia champaca* L. // J. Nanosci. Nanotechnol. 2016. V. 16. P. 7345–7357.
156. Jabir M.S., Taha A.A., Sahib U.I. Linalool loaded on glutathione-modified gold nanoparticles: a drug delivery system for a successful antimicrobial therapy // Artif. Cells Nanomed. Biotechnol. 2018. V. 46, No Suppl. 2. P. 1–11.
157. Jackson E. et al. Templated biomimetic silica nanoparticles // Langmuir. 2015. V. 31, No 12. P. 3687–3695.
158. Jacob J., Mukherjee T., Kapoor S. A simple approach for facile synthesis of Ag, anisotropic Au and bimetallic (Ag/Au) nanoparticles using cruciferous vegetable extracts // Mater. Sci. Eng. C. 2012. V. 32, No 7. P. 1827–1834.
159. Jacob J.M. et al. Microalgae: a prospective low cost green alternative for nanoparticle synthesis // Curr. Opin. Environ. Sci. Health. 2020. V20. P. 100163.
160. Jain D., Kothari S. Green synthesis of silver nanoparticles and their application in plant virus inhibition // J. Mycol. Plant Pathol. 2014. V. 44, No 1. P. 21–24.
161. Jain S., Mehata M.S. Medicinal plant leaf extract and pure flavonoid mediated green synthesis of silver nanoparticles and their enhanced antibacterial property // Scientific Reports. 2017. V. 7, No 1.
162. Jayaseelan C. et al. Green synthesis of gold nanoparticles using seed aqueous extract of *Abelmoschus esculentus* and its antifungal activity // Ind. Crops Prod. 2013. V. 45. P. 423–429.
163. Jayaseelan C. et al. Novel microbial route to synthesize ZnO nanoparticles using *Aeromonas hydrophila* and their activity against pathogenic bacteria and fungi // Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc. 2012. V. 90. P. 78–84.
164. Jiang W., Mashayekhi H., Xing B. Bacterial toxicity comparison between nano- and micro-scaled oxide particles // Environ. Pollut. 2009. V. 157, No 5. P. 1619–1625.
165. Jigyasa R.J.K. Bio-polyphenols promoted green synthesis of silver nanoparticles for facile and ultra-sensitive colorimetric detection of melamine in milk // Biosens. Bioelectron. 2018. V. 120. P. 153–159.
166. Jung, J.H. et al. Metal nanoparticle generation using a small ceramic heater with a local heating area // Journal of Aerosol Science. 2006. V. 37, No 12. P. 1662–1670.
167. Kalak J., Prashob P.J., Chandramohanakumar N. Analysis of Antimicrobial Potential of silver nanoparticles synthesized by fucoidan isolated from *Turbinaria conoides* // Int. J. Pharmacogn. Phytochem. Res. 2016. V.8. P. 1959–1963.
168. Kalpana V. et al. Biosynthesis of zinc oxide nanoparticles using culture filtrates of *Aspergillus niger*: antimicrobial textiles and dye degradation studies // OpenNano. 2018. V. 3. P. 48–55.
169. Kalsaitkar P. et al. Silver nanoparticles induced effect on *in-vitro* callus production in *Bacopa monnieri* // Asian J. Biol. Sci. 2014. V. 3, No 3. P. 167–172.

170. Kamenev D.G. et al. Silicon crystals formation using silicatein-like cathepsin of marine sponge *Latrunculia oparinae* // J. Nanosci. Nanotechnol. 2015. V. 15, No 12. P. 10046–10049.
171. Katifelis H. et al. Ag/Au bimetallic nanoparticles induce apoptosis in human cancer cell lines via P53, CASPASE-3 and BAX/BCL-2 pathways // Artif. Cells Nanomed. Biotechnol. 2018. V. 46, No Suppl. S3. P. S389–S398.
172. Kaur P. et al. Management of wilt disease of chickpea *in vivo* by silver nanoparticles biosynthesized by rhizospheric microflora of chickpea (*Cicer arietinum*) // J. Chem. Technol. Biotechnol. 2018. V. 93. P. 3233–3243.
173. Khajuria A. et al. Callus mediated biosynthesis and antibacterial activities of zinc oxide nanoparticles from *Viola canescens*: an important himalayan medicinal herb // SN Appl. Sci. 2019. V. 1, No 5. P. 455.
174. Khalil M.N., El-Ghany A.S., Couto R. Antifungal and antimycotoxin efficacy of biogenic silver nanoparticles produced by *Fusarium chlamydosporum* and *Penicillium chrysogenum* at non-cytotoxic doses // Chemosphere. 2019. V. 218. P. 477–486.
175. Khamhaengpol A., Siri S. Fluorescent light mediated a green synthesis of silver nanoparticles using the protein extract of weaver ant larvae // J. Photochem. Photobiol. B. 2016. V. 163. P. 337–344.
176. Khan I., Saeed K., Khan I. (2017). Nanoparticles: properties, applications and toxicities // Arab. J. Chem. 2019. V. 12, No7. P. 908–931.
177. Khan I., Saeed K., Khan I. Nanoparticles: properties, applications and toxicities // Arab. J. Chem. 2019. V. 12, No 7. P. 908–931.
178. Kim D., Jeong S., Moon J. Synthesis of silver nanoparticles using the polyol process and the influence of precursor injection // Nanotechnology. 2006. V. 17, No 16. P. 4019–4024.
179. Kim J.S. et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles // Nanomed.: Nanotechnol. Biol. Med. 2007. V. 3. P. 95–101.
180. Kisailus D. et al. Enzymatic synthesis and nanostructural control of gallium oxide at low temperature // Adv Mater. 2005. V. 17. P. 314–318.
181. Kisailus D. et al. Self-assembled bifunctional surface mimics an enzymatic and templating protein for the synthesis of a metal oxide semiconductor // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006. V. 103. P. 5652–5657.
182. Kobylinska N. et al. ‘Hairy’ root extracts as source for ‘green’ synthesis of silver nanoparticles and medical applications // RSC Adv. 2020. V. 10. P. 39434–39446.
183. Kojima C. et al. Preparation of near- infrared light absorbing gold nanoparticles using polyethylene glycol- attached dendrimers // Colloids Surf. B. 2010. V. 81, No 2. P. 648–651.
184. Kokina I. et al. Penetration of nanoparticles in flax (*Linum usitatissimum* L.) calli and regenerants // J. Biotechnol. 2013. V. 165, No 2. P. 127–132.
185. Kong J., Yu S. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures // Acta Biochim. Biophys. Sin. 2007. V. 39. P. 549–559.
186. Koopi H., Buazar F. A novel one-pot biosynthesis of pure alpha aluminum oxide nanoparticles using the macroalgae *Sargassum ilicifolium*: a green marine approach // Ceram. Int. 2018. V. 44, No 8. P. 8940–8945.

187. Kovarik M.K., Jacobson S.C. Nanofuidics in lab-on-a-chip devices // *Anal. Chem.* 2009. V. 81, No 17. P. 7133–7140.
188. Kozhemyako V.B. et al. Silicatein genes in spicule-forming and nonspicule-forming *Pacific demosponges* // *Mar Biotechnol.* 2010. V. 12. P. 403–409.
189. Kracht S. et al. Electron transfer in peptides: on the formation of silver nanoparticles // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2015. V. 54. P. 2912–2916.
190. Kravets V. et al. Imaging of biological cells using luminescent silver nanoparticles // *Nanoscale Res. Lett.* 2016. V. 11, No 1. P. 30.
191. Kruszka D. et al. Silver nanoparticles affect phenolic and phytoalexin composition of *Arabidopsis thaliana* // *Sci. Total Environ.* 2019. P. 135361.
192. Kuchekar S.R., Patil M.P., Han S.-H. Biosynthesis of silver nanoparticles using *Nicotiana tabaccum* leaf extract // *World J. Pharm. Pharm. Sci.* 2015. V. 4. P. 1609–1616.
193. Kumar A.S. et al. Nitrate reductase-mediated synthesis of silver nanoparticles from AgNO<sub>3</sub> // *Biotechnol Lett.* 2007. V. 29, No 3. 439–45.
194. Kumar S.A. et al. Extracellular biosynthesis of CdSe quantum dots by the fungus, *Fusarium oxysporum* // *J. Biomed. Nanotech.* 2007. V. 3, No 2. P. 190–194.
195. Kumar V. et al. Gold nanoparticle exposure induces growth and yield enhancement in *Arabidopsis thaliana* // *Sci. Total Environ.* 2013. P. 461–468.
196. Kumaresan M. et al. Seaweed *Sargassum wightii* mediated preparation of zirconia (ZrO<sub>2</sub>) nanoparticles and their antibacterial activity against gram positive and gram negative bacteria // *Microb. Pathog.* 2018. V. 124. P. 311–315.
197. Kumari R.M. et al. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using *Aspergillus terreus*: evaluation of its antibacterial and anticancer potential // *Mater. Today Proc.* 2020. V. 11, No 2. P. 1–12.
198. Lashin I. et al. Antimicrobial and in vitro cytotoxic efficacy of biogenic silver nanoparticles (Ag-NPs) fabricated by callus extract of *Solanum incanum* L. // *Biomolecules.* 2021. V. 11, No 3. P. 341.
199. Laurent S. et al. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications // *Chem. Rev.* 2008. V. 108, No 6. P. 2064–2110.
200. Lee D.E. et al. Multifunctional nanoparticles for multimodal imaging and theragnosis // *Chem. Soc. Rev.* 2012. V. 41, No 7. P. 2656–2672.
201. Lee E. et al. Solution structure of peptide AG4 used to form silver nanoparticles // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008. V. 376. P. 595–598.
202. Lee S.H., Jun B.-H. Silver nanoparticles: synthesis and application for nanomedicine // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20, No 4. P. 865.
203. Leifert C., Cassells A.C. Microbial hazards in plant tissue and cell cultures // *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant.* 2001. V. 37. P. 133–138.
204. Leifert C., Morris C.E., Waites W.M. Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue culture and field-grown plants: reasons for contamination problems *in vitro* // *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* 1994. V. 13, No 2. P. 139–183.

205. Lesani P. et al. Nanostructured  $\text{MnCO}_2\text{O}_4$  synthesized via co-precipitation method for SOFC interconnect application // *Int. J. Hydrog. Energy*. 2016. V. 41, No 45. P. 20640–20649.
206. Li H. et al. Characterization of saccharides and phenolic acids in the chinese herb tanshen by ESI-FT-ICR-MS and HPLC. *J. Mass Spectrom.* 2008. V. 43. P. 1545–1552.
207. Li J. et al. Biosynthesis of Au, Ag and Au-Ag bimetallic nanoparticles using protein extracts of *Deinococcus radiodurans* and evaluation of their cytotoxicity // *Int. J. Nanomedicine*. 2018. V. 13. P. 1411–1424.
208. Li S. et al. Green synthesis of silver nanoparticles using *Capsicum annuum* L. extract // *Green Chem.* 2007. V. 9. P. 852–858.
209. Li Y. et al. Anti-Inflammatory effects of cerium dioxide nanoparticles on peritonitis in rats induced by *Staphylococcus epidermidis* infection // *Adv. Polym. Technol.* 2020. P. 1–9.
210. Liao M. et al. Systematic identification of shikonins and shikonofurans in medicinal *Zicao species* using ultra-high performance liquid chromatography quadrupole time of flight tandem mass spectrometry combined with a data mining strategy // *J. Chromatogr. A*. 2015. V. 1425. P. 158–172.
211. Liu J.H. et al. Synergistic effect in an AuAg alloy nanocatalyst: CO oxidation // *Phys. Chem. B*. 2005. V. 109, No 1. P. 40–43.
212. Liu K., Catchmark J.M. Enhanced mechanical properties of bacterial cellulose nanocomposites produced by co-culturing *Gluconacetobacter hansenii* and *Escherichia coli* under static conditions // *Carbohydr. Polym.* 2019. V. 219. P. 12–20.
213. Lomelí-Rosales D.A. et al. One-step synthesis of gold and silver non-spherical nanoparticles mediated by eosin methylene blue agar // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. P. 19327.
214. Lukianova-Hleb E.Y. et al. Cell-specific transmembrane injection of molecular cargo with gold nanoparticle-generated transient plasmonic nanobubbles // *Biomater.* 2012. V. 33, No 21. P. 5441–5450.
215. Machado S. et al. Characterization of green zero-valent iron nanoparticles produced with tree leaf extracts // *Sci. Total Environ.* 2015. V. 533. P. 76–81.
216. Mafune F. et al. Formation of gold nanoparticles by laser ablation in aqueous solution of surfactant // *J. Phys. Chem. B*. 2001. V. 105, No 22. P. 5114–5120.
217. Mahdieha M. et al. Green biosynthesis of silver nanoparticles by *Spirulina platensis* // *Sci. Iran. F*. 2012. V. 19, No 3. P. 926–929.
218. Mahna N., Vahed S.Z., Khani S. Plant *in vitro* culture goes nano: nanosilver-mediated decontamination of *ex vitro* explants // *J. Nanomed. Nanotechnol.* 2013. V. 2, No 4. P. 161.
219. Makhazen D.S. et al. RNA inhibition of the *JAZ9* gene increases the production of resveratrol in grape cell cultures // *PCTOC*. 2021.
220. Malarkodi C. et al. Biosynthesis and antimicrobial activity of semiconductor nanoparticles against oral pathogens // *Bioinorg. Chem. Appl.* 2014. V. 2014. P. 1–10.
221. Malyarenko O.S., Ermakova S.P. Fucoidans: anticancer activity and molecular mechanisms of action // *Seaweed Polysaccharides*. 2017. V. 175–203.
222. Manivasagan P. et al. Biosynthesis, antimicrobial and cytotoxic effect of silver nanoparticles using a novel *Nocardiopsis sp.* MBRC-1 // *Biomed. Res. Int.* 2013. P. 287638.

223. Mansur H.S. et al. FTIR and UV-vis study of chemically engineered biomaterial surfaces for protein immobilization // *Spectroscopy*. 2002. V. 16. P. 351–360.
224. Mariappan G., Sundaraganesan N., Manoharan S. Experimental and theoretical spectroscopic studies of anticancer drug rosmarinic acid using HF and density functional theory // *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2012. V. 97. P. 340–351.
225. Marslin G., Sheeba C.J., Franklin G. Nanoparticles alter secondary metabolism in plants via ROS Burst // *Front. Plant Sci.* 2017. V. 8.
226. Masum M.M.I. et al. Biogenic synthesis of silver nanoparticles using *Phyllanthus emblica* fruit extract and its inhibitory action against the pathogen *Acidovorax oryzae* strain RS-2 of rice bacterial brown stripe // *Front. Microbiol.* 2019. V. 10. P. 820.
227. Mazhar T., Shrivastava V., Singh R.T. Green synthesis of bimetallic nanoparticles and its applications: a review // *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 2017. V. 9, No 2. P. 102–110.
228. Mellinas C., Jiménez A., Garrigós M.D.C. Microwave-assisted green synthesis and antioxidant activity of selenium nanoparticles using *Theobroma cacao* L. bean shell extract // *Molecules*. 2019. V. 24. P. 4048.
229. Mishra D. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Senecio rufinervis* DC. (Asteraceae) // *IJNPR*. 2011. V. 2. P. 44–47.
230. Mishra S. et al. Biofabricated silver nanoparticles act as a strong fungicide against *Bipolaris sorokiniana* causing spot blotch disease in wheat // *PLoS ONE*. 2014. V. 9, No 5. P. e97881.
231. Mishra S. et al. Potential of biosynthesized silver nanoparticles using *Stenotrophomonas sp.* BHU-S7 (MTCC 5978) for management of soil-borne and foliar phytopathogens // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. P. 45154.
232. Mishra V., Gupta U., Jain, N.K. Influence of different generations of poly (propylene imine) dendrimers on human erythrocytes // *Die Pharmazie*. 2010. V. 65, No 12. P. 891–895.
233. Mittal A.K., Chisti Y., Banerjee U.C. Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts // *Biotechnol. Adv.* 2013. V. 31, No 2. P. 346–356.
234. Mittal D. et al. Nanoparticle-based sustainable agriculture and food science: recent advances and future outlook // *Front. Nanotechnol.* 2020. V. 2. P. 579954.
235. Mock J.J. et al. Shape effects in plasmon resonance of individual colloidal silver nanoparticles // *J. Chem. Phys.* 2002. V. 116, No 15. P. 6755–6759.
236. Mohammadnejad R. et al. Necrotic, apoptotic and autophagic cell fates triggered by nanoparticles // *Autophagy*. 2018. V. 15, No 1. P. 4–33.
237. Moreno D. et al. Decoration of multi-walled carbon nanotubes with metal nanoparticles in supercritical carbon dioxide medium as a novel approach for the modification of screen-printed electrodes // *Talanta*. 2016. V. 161, No 1. P. 775–779.
238. Mosley O. Sample introduction interface for on-chip nucleic acid-based analysis of *Helicobacter pylori* from stool samples // *Lab Chip*. 2016. V. 16. P. 2108–2115.
239. Mostafavi E., Babaei A., Ataie A. Synthesis of nano-structured La<sub>0.6</sub>Sr<sub>0.4</sub>Co<sub>0.2</sub>Fe<sub>0.8</sub>O<sub>3</sub> perovskite by co-precipitation method // *J. Ultrafine Grained Nanostruct. Mater.* 2015. V. 48, No 1. P. 45–52.

240. Mousavi B., Tafvizi F., Bostanabad Z.S. Green synthesis of silver nanoparticles using *Artemisia turcomanica* leaf extract and the study of anti-cancer effect and apoptosis induction on gastric cancer cell line (AGS) // *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* 2018. V. 46. P. 499–510.
241. MubarakAli D. et al. Plant extract mediated synthesis of silver and gold nanoparticles and its antibacterial activity against clinically isolated pathogens // *Colloids Surf. B.* 2011. V. 85, No 2. P. 360–365.
242. Mude N. et al. Synthesis of silver nanoparticles using callus extract of *Carica papaya*—a first report // *J. Plant. Biochem. Biotechnol.* 2009. V. 18. P. 83–86.
243. Mukha I. et al. Anticancer effect of Ag, Au, and Ag/Au bimetallic nanoparticles prepared in the presence of tryptophan // *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2017. V. 17. P. 8987–8994.
244. Mukherjee P. et al. Extracellular synthesis of gold nanoparticles by the fungus *Fusarium oxysporum* // *ChemBioChem.* 2002. V. 3, No5. P. 461–463.
245. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* 1962. V. 15. P. 473–497.
246. Murugesan S., Bhuvanewari S., Sivamurugan V. Green synthesis, characterization of silver nanoparticles of a marine red alga *Spyridia fusiformis* and their antibacterial activity // *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 2017. V. 9. P. 192–197.
247. Nabikhan A. et al. Synthesis of antimicrobial silver nanoparticles by callus and leaf extracts from saltmarsh plant, *Sesuvium portulacastrum* L // *Colloids Surf. B.* 2010. V. 79. P. 488–493.
248. Nadagouda M.N., Varma R.S. Green synthesis of silver and palladium nanoparticles at room temperature using coffee and tea extract // *Green Chem.* 2008. V. 10, No 8. P. 859–862.
249. Naik R.R. et al. Biomimetic synthesis and patterning of silver nanoparticles // *Nat Mater.* 2002. V. 1. P. 169–172.
250. Nartop P. Effects of surface sterilisation with green synthesised silver nanoparticles on *Lamiaceae* seeds // *IET Nanobiotechnol.* 2018. V. 12. P. 663–668.
251. Natalio F. et al. Bioengineering of the silicapolymerizing enzyme silicatein-a for a targeted application to hydroxyapatite // *Acta Biomater.* 2010. V. 6. P. 3720–3728.
252. Nath D., Banerjee P. Green nanotechnology – a new hope for medical biology // *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2013. V. 36, No 3. P. 997–1014.
253. Navalon S. et al. Gold on diamond nanoparticles as a highly efficient Fenton catalyst // *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* 2010. V. 49. P. 8403–8407.
254. Navas M.P., Soni R.K. Laser-generated bimetallic AgAu and AgCu core-shell nanoparticles for refractive index sensing // *Plasmonics.* 2014. V. 12, No. 4. P. 359.
255. Neves M. et al. Modulation of organogenesis and somatic embryogenesis by ethylene: an overview // *Plants.* 2021. V. 10, No 6. P. 1208.
256. Nguyen V.P. et al. Contrast agent enhanced multimodal photoacoustic microscopy and optical coherence tomography for imaging of rabbit choroidal and retinal vessels *in vivo* // *Sci Rep.* 2019. V. 9, No 1. P. 5945.
257. Nikaido H. Multidrug resistance in bacteria // *Annu. Rev. Biochem.* 2009. V. 78, No 1. P. 119–146.
258. Nikoobakht B., El-Sayed M.A. Preparation and growth mechanism of gold nanorods (NRs) using seed-mediated growth method // *Chem. Mater.* 2003. V. 15, No 10. P. 1957–1962.

259. Noroozi M. et al. Green formation of spherical and dendritic silver nanostructures under microwave irradiation without reducing agent // *Int. J. Mol. Sci.* 2012. V. 13. P. 8086–8096.
260. Noruzi M. Biosynthesis of gold nanoparticles using plant extracts // *Bioprocess and biosystems engineering*. 2015. V. 38. P. 1–14.
261. Ogunyemi S.O. et al. Biosynthesis and characterization of magnesium oxide and manganese dioxide nanoparticles using *Matricaria chamomilla* L. extract and its inhibitory effect on *Acidovoraxoryzae* strain RS-2 // *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* 2019a. V. 47. P. 2230–2239.
262. Ogunyemi S.O. et al. Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using different plant extracts and their antibacterial activity against *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* // *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* 2019b. V. 47. P. 341–352.
263. Onditi M. et al. Degradation of rhodamine B dye by cactus polysaccharide-synthesized silver nanoparticles monitored by fluorescence excitation-emission matrix (FEEM) spectroscopy // *Starch*. 2019. V. 71. P. 5–6.
264. Ovais M. et al. Nanoantibiotics: recent developments and future prospects // *Front. Clin. Drug Res. Anti Infect.* 2019. V. 5. P. 158–174.
265. Oves M. et al. Antibacterial silver nanomaterial synthesis from *Mesoflavibacter zeaxanthinifaciens* and targeting biofilm formation // *Front. Pharmacol.* 2019. V. 10. P. 801.
266. Paknejadi P. et al. Concentration- and Time-Dependent Cytotoxicity of Silver Nanoparticles on Normal Human Skin Fibroblast Cell Line // *Iran. Red Crescent Med. J.* 2018. V. 20, No 10.
267. Pal S., Tak Y.K., Song J.M. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2007. V. 73, No 6. P. 1712–1720.
268. Pamirsky I.E., Golokhvast K.S. Silaffins of diatoms: from applied biotechnology to biomedicine // *Marine drugs*. 2013. V. 11, No 9. P. 3155–3167.
269. Pan Y. et al. Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles // *Small*. 2007. V. 3, No 11. P. 1941–1949.
270. Pardhi D.M. et al. Anti-bacterial activity of inorganic nanomaterials and their antimicrobial peptide conjugates against resistant and non-resistant pathogens // *Int. J. Pharm.* 2020. V. 586, No 1. P. 119531.
271. Pathak N., Zaidi R. Studies on seed-borne fungi of wheat in seed health testing programme // *Arch. Phytopathol. Pflanzenschutz*. 2012. V. 46. P. 389–401.
272. Paulkumar K. et al. *Piper nigrum* leaf and stem assisted green synthesis of silver nanoparticles and evaluation of its antibacterial activity against agricultural plant pathogens // *Sci. World J.* 2014. V. 2014. P. 829894.
273. Pavani T. et al. Microbial synthesis of ZnO nanoparticles by yeast: *Sacchromyces cerevisiae* // *J. Nanosci. Nanoeng. Appl.* 2015. V. 5, No 2. P. 1–5.
274. Payne J.N. et al. Novel synthesis of kanamycin conjugated gold nanoparticles with potent antibacterial activity // *Front. Microbiol.* 2016. V. 7. P. 607.
275. Peigneux A. et al. Learning from magnetotactic bacteria: a review on the synthesis of biomimetic nanoparticles mediated by magnetosome-associated proteins // *J. Struct. Biol.* 2016. V. 196. P. 75–84.

276. Pena-Rodriguez O., Pal U. Enhanced plasmonic behavior of bimetallic (AgAu) multilayered spheres // *Nanoscale Res. Lett.* 2011. V. 6, No 1. P. 279.
277. Pereira O.R. et al. Simultaneous characterization and quantification of phenolic compounds in *Thymus x Citriodorus* using a validated HPLC–UV and ESI–MS combined method // *Food Res. Int.* 2013. V. 54. P. 1773–1780.
278. Pérez-Caballero F., Peikolainen A.-L., Koel M. Preparation of nanostructured carbon materials // *Pest Manag. Sci.* 2008. V. 57, No 1. P. 48–53.
279. Petros R.A., Desimone J.M. Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2010. V. 8, No 9. P. 615–627.
280. Philip D. Green synthesis of gold and silver nanoparticles using *Hibiscus rosasinensis* // *Physica E Low Dimens. Syst. Nanostruct.* 2010. V. 42, No 5. P.1417–1424.
281. Pimprikar P.S. et al. Influence of biomass and gold salt concentration on nanoparticle synthesis by the tropical marine yeast *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 // *Colloids Surf. B.* 2009. V. 74, No 1. P. 309–316.
282. Pinheiro A.V. et al. Challenges and opportunities for structural DNA nanotechnology // *Nat. Nanotechnol.* 2011. V. 12, No 6. P. 763–772.
283. Ponmurugan P. et al. Antifungal activity of biosynthesised copper nanoparticles evaluated against red root-rot disease in tea plants // *J. Exp. Nanosci.* 2016. V. 11, No 13. P. 1019–1031.
284. Poulaki E.G. et al. The ethylene biosynthesis genes ACS2 and ACS6 modulate disease severity of *Verticillium dahlia* // *Plants.* 2020. V. 9, No 7. P. 907.
285. Pradhan N., Pal A., Pal T. Silver nanoparticle catalyzed reduction of aromatic nitro compounds // *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.* 2002. V. 196, No 2. P. 247–257.
286. Prasad K.S. et al. Biogenic synthesis of silver nanoparticles using *Nicotiana tobaccum* leaf extract and study of their antibacterial effect // *Afr J Biotechnol.* 2011. V. 10. P. 8122–8130.
287. Prodan E. et al. A hybridization model for the plasmon response of complex nanostructures // *Science.* 2003. V. 5644, No 302. P. 419–422.
288. Pult-Prociak J., Banach M. Silver nanoparticles – a material of the future...? // *Open Chem.* 2016. V. 14, No 1. P. 76–91.
289. Pytlik N. et al. Biological synthesis of gold nanoparticles by the diatom *Stephanopyxis turris* and *in vivo* SERS analyses // *Algal. Res.* 2017. V. 28. P. 9–15.
290. Qian Y. et al. Biosynthesis of silver nanoparticles by the endophytic fungus *Epicoccum nigrum* and their activity against pathogenic fungi // *Bioprocess. Biosyst. Eng.* 2013. V. 36. P. 1613–1619.
291. Qin Y.H. et al. Response of *in vitro* strawberry to antibiotics // *Plant Growth Regul.* 2011. V. 65. P.183–193.
292. Raj T.G.D.B., Khan N.A. Designer nanoparticle: nanobiotechnology tool for cell biology // *Nano Converg.* 2016. V. 3, No 1. P. 22.
293. Rajendra R. et al. Use of zinc oxide nanoparticles for production of antimicrobial textiles // *Int. J. Eng. Sci. Technol.* 2010. V. 1, No 2. P. 202–208.
294. Rajesh K.M. et al. Assisted green synthesis of copper nanoparticles using *Syzygium aromaticum* bud extract: physical, cal and antimicrobial properties // *Optik.* 2018. V. 154. P. 593–600.

295. Rajeshkumar S. et al. Anticancer and enhanced antimicrobial activity of biosynthesized silver nanoparticles against clinical pathogens // *J. Mol. Struct.* 2016. V. 1116. P. 165–173.
296. Rajiv P., Rajeshwari S., Venkatesh R. Bio-fabrication of zinc oxide nanoparticles using leaf extract of *Parthenium hysterophorus* L. and its size-dependent antifungal activity against plant fungal pathogens // *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2013. V. 112. P. 384–387.
297. Raju D., Mehta U., Ahmad A. Extra- and intracellular gold nanoparticles synthesis using live peanut callus cells // *Curr. Nanosci.* 2013. V. 9. P. 107–112.
298. Raju D., Mendapara R. Mehta U.J. Protein mediated synthesis of Au–Ag bimetallic nanoparticles // *Mater. Lett.* 2014. V. 124. P. 271–274.
299. Ramakritinan C.M. et al. Antibacterial effects of Ag, Au and bimetallic (AgAu) nanoparticles synthesized from red algae // *Solid State Phenom.* 2013. V. 10, No 12. P. 2453.
300. Ramanathan R. Bacterial kinetics controlled shape-directed biosynthesis of silver nanoplates using *Morganella psychrotolerans* // *Langmuir.* 2011. V. 27, No 2. P. 714–719.
301. Ramkumar V.S. et al. Biofabrication and characterization of silver nanoparticles using aqueous extract of seaweed *Enteromorpha compressa* and its biomedical properties // *Biotechnol. Rep.* 2017. V. 14. P. 1–7.
302. Rastogi A. et al. Impact of metal and metal oxide nanoparticles on plant: a critical review // *Front. Chem.* 2017. V. 5, No 78.
303. Roda A. et al. Bioengineered bioluminescent magnetotactic bacteria as a powerful tool for chip-based whole-cell biosensors // *Lab Chip.* 2013. V. 13, No 24. P. 4881–4889.
304. Rostami A.A., Shahsavari A. Nano-silver particles eliminate the *in vitro* contaminations of olive ‘mission’ explants // *Asian J. Plant Sci.* 2009. V. 8, No 7. P. 505–509.
305. Roy K., Sarkar C.K., Ghosh C.K. Photocatalytic activity of biogenic silver nanoparticles synthesized using yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) extract // *Appl Nanosci.* 2014. V. 5, No 8. P. 953–959.
306. Safavi K. et al. The study of nano silver (NS) antimicrobial activity and evaluation of using NS in tissue culture media // *Int. Conf. Life Sci.* 2011. V. 3. P. 159–161.
307. Saifuddin N., Wong C.W., Yasumira N.A.A. Rapid biosynthesis of silver nanoparticles using culture supernatant of bacteria with microwave irradiation // *E- J. Chem. (Online).* 2009. V. 6, No 1. P. 61–70.
308. Salari Z. et al. Sustainable synthesis of silver nanoparticles using macroalgae *Spirogyra varians* and analysis of their antibacterial activity // *J. Saudi Chem. Soc.* 2016. V. 20. P. 459–464.
309. Salunke B.K. et al. Comparative study of MnO<sub>2</sub> nanoparticle synthesis by marine bacterium *Saccharophagus degradans* and yeast *Saccharomyces cerevisiae* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2015. V. 99, No 13. P. 5419–5427.
310. Salunke G.R. et al. Rapid efficient synthesis and characterization of silver, gold, and bimetallic nanoparticles from the medicinal plant *Plumbago zeylanica* and their application in biofilm control // *Int. J. Nanomed.* 2014. V. 9. P. 2635–2653.
311. Salvadori M.R. et al. Intracellular biosynthesis and removal of copper nanoparticles by dead biomass of yeast isolated from the wastewater of a mine in the Brazilian Amazonia // *PLoS ONE.* 2014. V. 9, No 1. P. e87968.

312. Sarwar A. et al. Regioselective sequential modification of chitosan via azide-alkyne click reaction: synthesis, characterization, and antimicrobial activity of chitosan derivatives and nanoparticles // PLoS One. 2015. V. 10, No 4. P. e0123084.
313. Satyavani K. et al. Biomedical potential of silver nanoparticles synthesized from calli cells of *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad. // J. Nanobiotechnol. 2011. V. 9, No 1. P. 43.
314. Schaffer B. et al. High-resolution surface plasmon imaging of gold nanoparticles by energy-filtered transmission electron microscopy // Phys. Rev. B. 2009. V. 79, No 4. P. 041401.
315. Schröder H.C. et al. Biofabrication of biosilicaglass by living organisms // Nat. Prod. Rep. 2008. V. 25, No 3. P. 455–474.
316. Schröder H.C. et al. Silicatein: nanobiotechnological and biomedical applications // Prog. Mol. Subcell. Biol. 2009. V. 47. P. 251–273.
317. Schrofel A. et al. Applications of biosynthesized metallic nanoparticles – a review // Acta Biomater. 2014. V. 10, No 10. P. 4023–4042.
318. Sengul A.B., Asmatulu E. Toxicity of metal and metal oxide nanoparticles: a review // Environ. Chem. Lett. 2020. V. 18. P. 1659–1683.
319. Seo H. et al. Ginseng-berry-mediated gold and silver nanoparticle synthesis and evaluation of their *in vitro* antioxidant, antimicrobial, and cytotoxicity effects on human dermal fibroblast and murine melanoma skin cell lines // Int. J. Nanomedicine. 2017. V. 12. P. 709–723.
320. Sershen S.R. et al. Temperature-sensitive polymer-nanoshell composites for photothermally modulated drug delivery // J. Biomed. Mater. Res. 2000. V. 51, No 3. P. 293–298.
321. Shah M. et al. Green synthesis of metallic nanoparticles via biological entities // Materials (Basel, Switzerland). 2015. V. 8, No 11. P. 7278–7308.
322. Shakeran Z. et al. Improvement of atropine production by different biotic and abiotic elicitors in hairy root cultures of *Datura metel* // Turk. J. Biol. 2015. V. 39. P. 111–118.
323. Shamailla S. et al. Gold nanoparticles: an efficient antimicrobial agent against enteric bacterial human pathogen // Nanomaterials. 2016. V. 6, No 4. P. 71.
324. Shankar S.S. et al. Rapid synthesis of Au, Ag, and bimetallic Au core-Ag shell nanoparticles using Neem (*Azadirachta indica*) leaf broth // Colloids Surf. B Biointerf. 2004. V. 275, No 2. P. 496–502.
325. Sharma A. et al. Algae as crucial organisms in advancing nanotechnology: a systematic review // J. Appl. Phycol. 2016. V. 28. P. 1759–1774.
326. Sharma P. et al. Silver nanoparticle-mediated enhancement in growth and antioxidant status of *Brassica juncea* // Appl. Biochem. Biotechnol. 2012. V. 167, No 8. P. 2225–2233.
327. Sharma, M. et al. TiO<sub>2</sub>-GO nanocomposite for photocatalysis and environmental applications: a green synthesis approach // Vacuum. 2018. V. 156. P. 434–439.
328. Shen D.S., Mathew J., Philip D. Phytosynthesis of Au, Ag and AuAg bimetallic nanoparticles using aqueous extract and dried leaf of *Anacardium occidentale* // Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. 2011. V. 79, No 1. P. 254–262.
329. Shi X. et al. Colorimetric and visual determination of acrylamide via acrylamide-mediated polymerization of acrylamide-functionalized gold nanoparticles // Microchim. Acta. 2018. V. 185. No 11. P. 522.

330. Shkryl Y.N. et al. Bioinspired enzymatic synthesis of silica nanocrystals provided by recombinant silicatein from the marine sponge *Latrunculia oparinae* // *Bioprocess Biosyst. Eng.* 2016. V. 39, No 1. P.53–58.
331. Shkryl Y.N. et al. Green synthesis of silver nanoparticles using transgenic *Nicotiana tabacum* callus culture expressing silicatein gene from marine sponge *Latrunculia oparinae* // *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* 2017. V. 46, No 8. P. 1–13.
332. Shmarakov I. et al. Antitumor activity of alloy and core-shell-type bimetallic AgAu nanoparticles // *Nanoscale Res. Lett.* 2017. V. 12. P. 333.
333. Singh J. et al. ‘Green’ synthesis of metals and their oxide nanoparticles: applications for environmental remediation // *J. Nanobiotechnol.* 2018. V. 16, No 1. P. 84.
334. Singh P. et al. Green synthesis of gold and silver nanoparticles from *Cannabis sativa* (industrial hemp) and their capacity for biofilm inhibition // *Int. J. Nanomed.* 2018. V. 13. P. 3571–3591.
335. Singh P. The development of a green approach for the biosynthesis of silver and gold nanoparticles by using *Panax ginseng* root extract, and their biological applications // *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* 2016. V. 44. P. 1150–1157.
336. Singh P., Kim Y.J., Yang D.C. A strategic approach for rapid synthesis of gold and silver nanoparticles by *Panax ginseng* leaves // *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* 2016. V. 44. P. 1949–1957.
337. Smita S. et al. Nanoparticles in the environment: assessment using the causal diagram approach // *Environ. Health.* 2012. V. 11, No Suppl. 1. P. S3.
338. Socrates G. Infrared and Raman characteristic group frequencies: tables and charts // Chichester: Wiley. 2004. P.347.
339. Sokolova R.V. et al. Composition, structural characteristics, and antitumor properties of polysaccharides from the brown algae *Dictyopteris polypodioides* and *Sargassum sp.* (Lebanon) // *Chem. Nat. Compd.* 2011. V. 47. P. 329–334.
340. Soleimani M., Habibi-Pirkoohi M. Biosynthesis of silver nanoparticles using *Chlorella vulgaris* and evaluation of the antibacterial efficacy against *Staphylococcus aureus* // *Avicenna J. Med. Biotechnol.* 2017. V. 9, No 3. P. 120–125.
341. Soto K. et al. Comparative *in vitro* cytotoxicity assessment of some manufactured nanoparticulate materials characterized by transmission electron microscopy // *J. Nanoparticle Res.* 2005. V. 7. P.145–169.
342. Spena A. et al. Independent and synergistic activity of *rolA*, *B* and *C* loci in stimulating abnormal growth in plants // *EMBO J.* 1987. V. 6. P. 3891–3899.
343. Stehfest K. et al. Fourier transform infrared spectroscopy as a new tool to determine rosmarinic acid *in situ* // *J. Plant. Physiol.* 2004. V. 161. P. 151–156.
344. Stenglein S.A. *Fusarium poae*: a pathogen that needs more attention // *Plant Pathol. J.* 2009. V. 91. P. 25–36.
345. Sumerel J.L. et al. Biocatalytic structure directing synthesis of titanium dioxide // *Chem. Mater.* 2003. V. 25, No 15. P. 4804–4809.
346. Sun Y. et al. Synthesis and optical properties of nanorattles and multiplewalled nanoshells/nanotubes made of metal alloys // *J. Am. Chem. Soc.* 2004. V. 126, No 30. P. 9399–9406.

347. Sun Y.-N. et al. Shape dependence of gold nanoparticles on *in vivo* acute toxicological effects and biodistribution // *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2011. V. 11, No 2. P. 1210–1216.
348. Syed A., Ahmad A. Extracellular biosynthesis of platinum nanoparticles using the fungus *Fusarium oxysporum* // *Colloids Surf. B.* 2012. V. 97. P. 27–31.
349. Syu Y.Y. et al. Impacts of size and shape of silver nanoparticles on Arabidopsis plant growth and gene expression // *Plant Physiol. Biochem.* 2014. V. 83. P. 57–64.
350. Szucova L. et al. Novel platinum (II) and palladium (II) complexes with cyclin-dependent kinase inhibitors: synthesis, characterisation and antitumor activity // *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 2006. V. 14, No 2. P. 479–491.
351. Tabassum S. et al. Synthesis and characterization of copper (II) and zinc (II)-based potential chemotherapeutic compounds: their biological evaluation viz. DNA binding profile, cleavage and antimicrobial activity // *Eur. J. Med. Chem.* 2012. V. 58. P. 308–316.
352. Tahir M.N. et al. Formation of layered titania and zirconia catalysed by surface-bound silicatein // *Chem. Commun. (Camb).* 2005. V. 28, No 44. P. 5533–5535.
353. Tahir M.N. et al. From single molecules to nanoscopically structured functional materials: a nanocrystal growth on TiO<sub>2</sub> nanowires controlled by surface-bound silicatein // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2006. V. 45, No 29. P. 4803–4809.
354. Tahir M.N. et al. Monitoring the formation of biosilica catalysed by histidine-tagged silicatein // *Chem. Commun. (Camb).* 2004. V. 24. P. 2848–2849.
355. Tamuly C. et al. In situ biosynthesis of Ag, Au and bimetallic nanoparticles using *Piper pedicellatum* C.DC: green chemistry approach // *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 2013. V. 102. P. 627–634.
356. Tan Y.N., Lee J.Y., Wang D.I. Uncovering the design rules for peptide synthesis of metal nanoparticles // *J Am Chem Soc.* 2010. V. 132. P. 677–5686.
357. Tanase C. et al. Antibacterial and antioxidant potential of silver nanoparticles biosynthesized using the spruce bark extract // *Nanomaterials.* 2019. V. 9, No 11. P. 1541.
358. Tao C. Antimicrobial activity and toxicity of gold nanoparticles: research progress, challenges and prospects // *Lett. Appl. Microbiol.* 2018. V. 67, No 6. P. 537–543.
359. Thompson D.G. et al. Synthesis of unique nanostructures with novel optical properties using oligonucleotide mixed–metal nanoparticle conjugates // *Small.* 2008. V. 8, No 4. P. 1054–1057.
360. Tien D.C. et al. Discovery of ionic silver in silver nanoparticle suspension fabricated by arc discharge method // *J. Alloys Compd.* 2008. V. 463, No 1. P. 408–411.
361. Tinti A. Recent applications of vibrational mid-infrared (IR) spectroscopy for studying soil components: a review // *J. Cent. Eur. Agric.* 2015. V. 16. P. 1–22.
362. Tiwari D.K., Behari J., Sen P. Application of nanoparticles in waste water treatment // *World Appl. Sci. J.* 2008. V. 3, No 3. P. 417–33.
363. Tiwari J., Kim K. Zero-dimensional, one-dimensional, two-dimensional and three-dimensional nanostructured materials for advanced electrochemical energy devices // *Prog. Mater. Sci.* 2012. V. 57, No 4. P. 724–803.
364. Tripathi R.M., Shrivastav B.R., Shrivastav A. Antibacterial and catalytic activity of biogenic gold nanoparticles synthesised by *Trichoderma harzianum*. *IET Nanobiotechnol.* 2018. V. 12. P. 509–513.

365. Troupis A., Hiskia A., Papaconstantinou E. Synthesis of metal nanoparticles by using polyoxometalates as photocatalysts and stabilizers // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2002. V. 41, No 11. P. 1911–1914.
366. Tsekhmistrenko S.I. et al. Bacterial synthesis of nanoparticles: a green approach // *Biosyst. Divers.* 2020. V. 28. P. 9–17.
367. Usoltseva R.V. et al. Fucoidans from brown algae *Laminaria longipes* and *Saccharina cichorioides*: structural characteristics, anticancer and radiosensitizing activity *in vitro* // *Carbohydr. Polym.* 2019. V. 221. P. 157–165.
368. Venkatesan J. et al. Preparation, characterization and biological applications of biosynthesized silver nanoparticles with chitosan-fucoidan coating // *Molecules.* 2018. V. 23. P. 1429.
369. Venkatpurwar V., Pokharkar V. Green synthesis of silver nanoparticles using marine polysaccharide: study of *in vitro* antibacterial activity // *Mater. Lett.* 2011. V. 65. P. 999–1002.
370. Venugopal K. et al. The impact of anticancer activity upon *Beta vulgaris* extract mediated biosynthesized silver nanoparticles (ag-nps) against human breast (MCF-7), lung (A549) and pharynx (Hep-2) cancer cell lines // *J. Photochem. Photobiol. B.* 2017. V. 173. P. 99–107.
371. Vereshchagina Y.V. et al. The *rolC* gene increases caffeoylquinic acid production in transformed artichoke cells // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2014. V. 98, No 18. P. 7773–7780.
372. Verma D.K., Hasan S.H., Banik R.M. Photo-catalyzed and phyto-mediated rapid green synthesis of silver nanoparticles using herbal extract of *Salvinia molesta* and its antimicrobial efficacy // *J. Photochem. Photobiol. B.* 2016 V. 155. P. 51–59.
373. Vijayakumari J. et al. A comparative study of plant mediated synthesis of silver, copper and zinc nanoparticles from *Tiliacora acuminata* (Lam.) Hook. F. and their antibacterial activity studies // *Synthesis.* 2019. V. 18. P. 19–34.
374. Wakaskar R.R. General overview of lipid-polymer hybrid nanoparticles, dendrimers, micelles, liposomes, spongosomes and cubosomes // *J. Drug Target.* 2018. V. 26, No 4. P. 311–318.
375. Wang C. et al. Preparation, characterization and application of polysaccharide-based metallic nanoparticles: a review // *Polymers.* 2017. V. 9, No 12. P. 689.
376. Wang L., Hu C., Shao L. The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future // *Int. J. Nanomed.* 2017. V. 12. P. 1227–1236.
377. Wang L. et al. The density of surface coating can contribute to different antibacterial activities of gold nanoparticles // *Nano Lett.* 2020. V. 20, No 7. P. 5036–5042.
378. Wang Z.D. et al. DNA-mediated control of metal nanoparticle shape: one-pot synthesis and cellular uptake of highly stable and functional gold nanoflowers // *Nano Lett.* 2010 V. 10, No 5. P. 1886–1891.
379. Xia Q.H., Ma Y.J., Wang J.W. Biosynthesis of silver nanoparticles using *Taxus yunnanensis* callus and their antibacterial activity and cytotoxicity in human cancer cells // *Nanomaterials.* 2016. V. 6, No 9. P. 160.
380. Xiang L. et al. Purified and sterilized magnetosomes from *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 were not toxic to mouse fibroblasts *in vitro* // *Lett. Appl. Microbiol.* 2007 V. 45, No 1. P. 75–81.

381. Xue B. et al. Biosynthesis of silver nanoparticles by the fungus *Arthroderma fulvum* and its antifungal activity against genera of *Candida*, *Aspergillus* and *Fusarium* // Int. J. Nanomed. 2016. V. 11. P. 1899–1906.
382. Yager P. et al. Microfluidic diagnostic technologies for global public health // Nature. 2006. V. 442, No 7101. P. 412–418.
383. Yamamoto H., Yazaki K., Inoue K. Simultaneous analysis of shikimate-derived secondary metabolites in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures by high-performance liquid chromatography // J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl. 2000. V. 738. P. 3–15.
384. Yamanaka M. et al. Bactericidal actions of a silver ion solution on *Escherichia coli*, studied by energy-filtering transmission electron microscopy and proteomic analysis // Appl. Environ. Microbiol. 2005. V. 71, No 11. P. 7589–7593.
385. Yan J., Zhang H., Chen B. Application of nanoparticles to reverse multi-drug resistance in cancer // Nanotechnol. Rev. 2016. V. 5, No 5.
386. Yan Q.-L. et al. Highly energetic compositions based on functionalized carbon nanomaterials // Nanoscale. 2016. V. 9, No 8. P. 4799–4851.
387. Yan Y. et al. Intermetallic nanocrystals: syntheses and catalytic applications // Adv. Mater. 2017. V. 29, No 14. P. 1605997.
388. Yano K. et al. Synthesis and characterization of magnetic FePt/Au core/shell nanoparticles // J. Phys. Chem. 2009. V. 113, No 30. P. 13088–13091.
389. Yen H.-J., Hsu S., Tsai C.-L. Cytotoxicity and immunological response of gold and silver nanoparticles of different sizes // Small. 2009. V. 5, No 13. P. 1553–1561.
390. You H. et al. Synthesis of colloidal metal and metal alloy nanoparticles for electrochemical energy applications // Chem. Soc. Rev. 2013. V. 42, No 7. P. 2880–2904.
391. Yuan Y.-G., Peng Q.-L., Gurunathan S. Silver nanoparticles enhance the apoptotic potential of gemcitabine in human ovarian cancer cells: combination therapy for effective cancer treatment // Int. J. Nanomedicine. 2017. V. 12. P. 6487–6502.
392. Zafar H. et al. Effect of ZnO Nanoparticles on *Brassica nigra* seedlings and stem explants: growth dynamics and antioxidative response // Front. Plant Sci. 2016. V. 7.
393. Zhan L., Peng L., Huang C.-Z. Stable silver nanoparticles–aptamer bioconjugates for cellular prion protein imaging // Sci. Bull. 2014. V. 59, No 10. P. 964–970.
394. Zhang W. et al. Comparative catalytic and bacteriostatic properties of silver nanoparticles biosynthesized using three kinds of polysaccharide // AIP Advances. 2018. V. 8. P. 065222.
395. Zhang Y. et al. Antimicrobial activity of gold nanoparticles and ionic gold // J. Environ. Sci. Health C Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev. 2015. V. 33, No 3. P. 286–327.
396. Zhang Y. et al. Chloroplasts-mediated biosynthesis of nanoscale Au-Ag alloy for 2-butanone assay based on electrochemical sensor // Nanoscale Res. Lett. 2012. V. 7, No 1. P. 475.
397. Zhao L. et al. Nano-biotechnology in agriculture: use of nanomaterials to promote plant growth and stress tolerance // J. Agricul. Food. Chem. 2020. V. 68, No 7. P. 1935–1947.
398. Zhao L., Ashraf M.A. Influence of silver-hydroxyapatite nanocomposite coating on biofilm formation of joint prosthesis and its mechanism // West Indian Med. J. 2015. V. 64, No 5. P. 506–513.

399. Zhao T., Li T., Liu Y. Silver nanoparticle plasmonic enhanced Förster resonance energy transfer (FRET) imaging of protein-specific sialylation on the cell surface // *Nanoscale*. 2017. V. 9, No 28. P. 9841–9847.
400. Zhao X.P. et al. Screening and identifying of nephrotoxic compounds in *Lithospermum erythrorhizon* using live-cell fluorescence imaging and liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry // *Chem. Res. Chin. Univ.* 2011. V. 27. P. 562–565.
401. Zheng D. et al. Preparation and application of a novel vanillin sensor based on biosynthesis of Au–Ag alloy nanoparticles // *Sens. Actuators B Chem.* 2010. V. 148, No 1. P. 247–252.
402. Zhou L., Yuan J., Wei Y. Core–shell structural iron oxide hybrid nanoparticles: from controlled synthesis to biomedical applications // *J. Mater. Chem.* 2011 V. 21, No 9. P. 2823–2840.
403. Zhou Y. et al. Crossing the blood-brain barrier with nanoparticles // *J. Control Release*. 2018. V. 270. P. 290–303.
404. Zielinska E. et al. Silver nanoparticles of different sizes induce a mixed type of programmed cell death in human pancreatic ductal adenocarcinoma // *Oncotarget*, 2017. V. 9, No 4. P. 4675–4697.