

На правах рукописи



ФАХРУЛЛИНА ГУЛЬНУР ИЛЬДАРОВНА

**АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЕ ДЕЙСТВИЕ НАНОКОНТЕЙНЕРОВ С КУРКУМИНОМ НА
МОДЕЛИ НЕМАТОД *CAENORHABDITIS ELEGANS***

03.02.03 – Микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань – 2020

Работа выполнена в научно-исследовательской лаборатории «Бионанотехнологии» Центра научной деятельности и аспирантуры и на кафедре микробиологии Института фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет».

Научный руководитель:

Фахруллин Равиль Фаридович,
доктор биологических наук

Официальные оппоненты:

Тремасова Анна Михайловна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник сектора тканевых технологий и производства препаратов при отделе токсикологии ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности», г. Казань.

Гурьев Евгений Леонидович, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории оптической тераностики Института биологии и биомедицины Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского, г. Нижний Новгород.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (г. Белгород).

Защита диссертации состоится «26» марта 2020 г. в 14.00 ч. на заседании диссертационного совета КФУ.03.07 при ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420008, Республика Татарстан, г. Казань, ул. Кремлевская, д. 18, в зале заседания ученого совета (аудитория 211).

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского при ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420008, Республика Татарстан, г. Казань, ул. Кремлевская, д. 35.

Электронная версия автореферата размещена на официальном сайте ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» <http://www.kpfu.ru>

Автореферат разослан «__» 2020 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

О.А. Кравцова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Микробиота желудочно-кишечного тракта играет ключевую роль в поддержании нормального функционирования организма человека путем ингибиования патогенных микроорганизмов [Kamada *et al.*, 2013], модулирования иммунной системы [Kelly *et al.*, 2005] и воздействия на процессы развития [Rawls *et al.*, 2004], обмена веществ [Rawls *et al.*, 2004], продолжительности жизни [Ottaviani *et al.*, 2011]. Нерациональное использование антибиотиков [Dethlefsen *et al.*, 2011] привело к существенным изменениям в нормальной микрофлоре кишечника человека, вызывающим такие патологические состояния, как ожирение, диабет, метаболический синдром, аутоиммунные расстройства, воспалительные и онкологические заболевания кишечника [Cho *et al.*, 2012; Claesson *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2017]. Чрезвычайно важными представляются поиск и изучение механизмов воздействия новых антибактериальных препаратов [Davis *et al.*, 2015; Ang *et al.*, 2015], нацеленных на патогенную микрофлору, и не влияющих на симбиотическую микрофлору. Появление патогенных штаммов, обладающих множественной устойчивостью к антибиотикам [Freire-Moran *et al.*, 2011; Holmes *et al.*, 2016], требует создания новых безопасных, эффективных и недорогостоящих противомикробных лекарственных средств, что нашло отражение в принятой в 2016 г. декларации Генеральной Ассамблеи Организации Объединенных Наций [Padiyara *et al.*, 2018].

Повышение устойчивости бактерий к антибиотикам и потеря их эффективности при лечении инфекций вызвали интерес исследователей к применению природных соединений в качестве терапевтических антимикробных средств. Полифенольные соединения считаются перспективной альтернативой антибиотикам благодаря их антимикробному действию в отношении широкого спектра клинически значимых патогенов человека [Daglia, 2012; Bisignano *et al.*, 2013; Payra *et al.*, 2016]. Одним из представителей полифенолов является куркумин, основной компонент корневища растения *Curcuma longa* L. [Kozaadam *et al.*, 2017], который проявляет противомикробную, противовоспалительную и антиоксидантную активность [Aggarwal *et al.*, 2013], оказывая благотворное влияние при различных заболеваниях пищеварительной, дыхательной, сердечно-сосудистой и нервной систем человека [Patel *et al.*, 2019]. Куркумин является гидрофобным соединением, обладающим низкой растворимостью в воде, что ограничивает его биологическую доступность и лекарственное применение [Hussain *et al.*, 2017]. Для расширения диапазона терапевтического применения куркумина решающее значение имеет улучшение его пероральной биодоступности.

Для повышения биодоступности куркумина предложены наноразмерные носители, такие как липосомы, мицеллы, полимерные и липидные наночастицы, пептидные носители и микроэмulsionи [Naksuriya *et al.*, 2014; Song *et al.*, 2017]. Наноглины, керамические наноразмерные неорганические материалы, также использовали в качестве носителей для доставки куркумина. В числе прочих, использовали галлуазит, трубчатый алюмосиликат, с наружным диаметром около 50 нм, внутренним диаметром просвета около 15 нм, и длиной 0.3-1 мкм [Lazzara *et al.*, 2018]. По сравнению с другими носителями лекарств, галлуазит является дешевым и доступным природным материалом, и в последнее время вызывает значительный интерес в биомедицинских применениях, включая материалы для обработки ран, тканевую инженерию, доставку лекарств [Lvov *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2014; Lvov *et al.*, 2016; He *et al.*, 2015]. Ряд исследований *in vitro* и *in vivo* подтвердил, что галлуазит является нетоксичным биосовместимым наноматериалом [Lvov *et al.*, 2016]. Однако, на сегодняшний день отсутствуют экспериментальные исследования по изготовлению наноконтейнеров на основе галлуазита и куркумина, направленных на уничтожение патогенной микрофлоры, не угнетающих при этом симбиотическую микрофлору кишечника. Такие наноконтейнеры для инициации высвобождения куркумина в кишечнике должны реагировать на определенные внутренние стимулы, например, на действие ферментами [Medina *et al.*, 2013].

Удобными модельными организмами для крупномасштабных *in vivo* исследований по обнаружению новых противомикробных препаратов и оценке селективного ингибиования патогенных бактерий являются всесторонне изученные и широко используемые в биологических

исследованиях свободноживущие нематоды *Caenorhabditis elegans* [Ewbank *et al.*, 2011; Leung *et al.*, 2008], которые в естественных условиях питаются микроорганизмами, при этом некоторые виды способны колонизировать кишечник червей, вызывая преждевременную смерть [Schulenburg *et al.*, 2017].

Исходя из вышеизложенного, весьма актуальным представляется разработка новых антимикробных препаратов и оценка возможности применения этих препаратов для избирательного подавления патогенных микроорганизмов без воздействия на нормальную кишечную микробиоту с помощью нематод *C. elegans*.

Целью исследования стало определение антибактериальной активности наноконтейнеров на основе нанотрубок галлуазита и куркумина, функционализированных декстрином, в условиях *in vitro* и *in vivo* с использованием нематод *Caenorhabditis elegans*.

В соответствии с поставленной целью решались следующие задачи:

- 1) Оценить воздействие природных алюмосиликатных нанотрубок галлуазита на жизнеспособность нематод *C. elegans*;
- 2) Создать и охарактеризовать ферментно-активируемые наноконтейнеры на основе куркумина и нанотрубок галлуазита;
- 3) В условиях *in vitro* определить антибактериальный потенциал синтезированных наноконтейнеров в отношении бактерий *Serratia marcescens* и *Escherichia coli* (патогенные и непатогенные микроорганизмы в отношении *C. elegans*, соответственно);
- 4) Определить эффективность доставки и высвобождения куркумина с использованием нематод *C. elegans*;
- 5) В условиях *in vivo* выявить противомикробное влияние наноконтейнеров на непатогенную и патогенную микрофлору с использованием в качестве модели хозяина нематод *C. elegans*;
- 6) Оценить воздействие наноконтейнеров на жизнедеятельность нематод *C. elegans* при инкубировании с патогенными и непатогенными бактериями.

Научная новизна

В рамках работы впервые были разработаны и исследованы наноконтейнеры на основе нанотрубок галлуазита, заполненные куркумином и покрытые биополимерной декстриновой защитной оболочкой, обладающие избирательным антимикробным действием в отношении патогенных бактерий. Впервые установлено, что загруженные куркумином наноконтейнеры эффективно подавляют рост бактерий *Serratia marcescens* и при этом не оказывают существенного влияния на симбиотические бактерии *Escherichia coli*. Загруженные куркумином наноконтейнеры были использованы для подавления инфекции, вызванной бактериями *S. marcescens* у многоклеточного организма – нематод *C. elegans*. Впервые показано, что разработанные наноконтейнеры эффективно подавляют токсические эффекты *S. marcescens* в организме нематод, что указывает на повышенную биодоступность гидрофобного куркумина. Впервые установлено, что куркумин-загруженные наноконтейнеры значительно увеличивают выживаемость нематод по сравнению с чистым куркумином. Впервые выявлено, что алюмосиликатные нанотрубки галлуазита являются биосовместимым наноматериалом для нематод *C. elegans*.

Научно-практическая значимость работы

Полученные в данном исследовании загруженные куркумином наноконтейнеры на основе нанотрубок галлуазита с защитной оболочкой из декстрина являются перспективным антимикробным препаратом для более эффективного, по сравнению с чистым куркумином, лечения инфекций, вызванных патогенными бактериями. Куркумин, загруженный в наноконтейнеры, может быть использован для лечения дисбактериоза путем селективного подавления болезнетворной микрофлоры. Последующие исследования могут быть сосредоточены на изготовлении таблеток для доставки куркумина в организм млекопитающих. Полученные результаты открывают многообещающие перспективы создания эффективных противомикробных нанопрепараторов на основе липофильных лекарств и нанотрубок галлуазита для инновационных методов лечения человека.

Основные положения, выносимые на защиту:

- ✓ Нанотрубки галлуазита в исследованных концентрациях (0.025-0.5 мг/чашка) не оказывают токсического влияния на организм нематод *Caenorhabditis elegans*, приводя при этом в высоких концентрациях к механическому раздражению пищеварительной системы.
- ✓ Наноконтейнеры на основе нанотрубок галлуазита, загруженные куркумином и защищенные внешним слоем декстрина, существенно подавляют рост и систему “Чувства кворума” у бактерий *Serratia marcescens* и незначительно влияют на бактерии *Escherichia coli*.
- ✓ Загруженные куркумином и покрытые декстрином наноконтейнеры, перорально вводимые в организм нематод *Caenorhabditis elegans*, эффективно подавляют токсические эффекты *S. marcescens* (повышенную кишечную колонизацию, образование биопленки, синтез продигиозина, накопление пигмента липофусцина и активных форм кислорода), в конечном итоге двукратно увеличивая продолжительность жизни нематод, инфицированных патогенными бактериями.
- ✓ Обработка куркумином-загруженными наноконтейнерами нематод, питающихся *E. coli*, увеличивает продолжительность жизни этих животных в 1.8 раз эффективнее по сравнению с нематодами, обработанными чистым куркумином. Гидрофобный куркумин, инкапсулированный в нанотрубки галлуазита, обладает лучшей биодоступностью в отличие от чистого куркумина.

Достоверность результатов

Достоверность полученных данных подтверждается значительным объемом многократных лабораторных экспериментов, выполненных и проанализированных с использованием современных высокоточных приборов, а также публикацией полученных результатов работы в международных и отечественных журналах с рецензированием ведущими учеными в данной области.

Апробация работы

Результаты диссертационной работы представлены в рамках нижеперечисленных международных и всероссийских конференций: V международная научная конференция «STRANN-2016: State-of-the-art trends of scientific research of artificial and natural nanoobjects» (Санкт-Петербург, 2016), XIII Российская ежегодная, с международным участием, конференция молодых научных сотрудников и аспирантов «Физикохимия и технология неорганических материалов» (Москва, 2017), III всероссийская молодежная научная школа-конференция с международным участием «Микробные симбиозы в природных и экспериментальных экосистемах» (Оренбург, 2017 г), 1-й Российской микробиологический конгресс (Пущино, 2017), всероссийская школа-конференция молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение и управление» (Нижний Новгород, 2016, 2017, 2018), 12-ый международный симпозиум Российского общества нематологов «Нематоды и другие линяющие организмы (Ecdysozoa) в процессах возрастающего антропогенного воздействия на экосистемы» (Нижний Новгород, 2017), международная конференция «Young biologists science week» (Карелия, 2017), XVI международная конференция «International Clay Conference ICC-2017» (Испания, Гранада, 2017), международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2018), международная школа-конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Материалы и технологии XXI века» (Казань, 2018), четвертый междисциплинарный научный форум с международным участием «Новые материалы и перспективные технологии» (Москва, 2018), II международная конференция «Современные синтетические методологии для создания лекарственных препаратов и функциональных материалов» (Екатеринбург, 2018), 8-ая международная конференция «Black sea basin conference on analytical chemistry» (Турция, Стамбул, 2018), международный конгресс «Changing the face of modern medicine:stem cell and gene therapy» (Швейцария, Лозанна, 2018), VI международная конференция «Современные биотехнологии для науки и практики» (Санкт-Петербург, 2019), Российско-Германский семинар “Interaction: from cell to human” (Казань, 2019), XI всероссийский конгресс молодых ученых-биологов с международным участием «Симбиоз-Россия» (Пермь, 2019), 6th international

conference on multifunctional, hybrid and nanomaterials HYMA2019 (Сиджес, Испания, 2019), The European society of gene and cell therapy (ESGCT) 27th annual congress (Испания, Барселона, 2019).

Место выполнения работы и личный вклад диссертанта

Экспериментальная часть диссертационной работы выполнена в научно-исследовательской лаборатории «Бионанотехнологии» Центра научной деятельности и аспирантуры и на кафедре микробиологии Института фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

Определение направления научного исследования, формулировка цели и постановка задач разработаны совместно с научным руководителем. Основную часть исследований, анализ литературных данных и интерпретацию полученных результатов диссертант выполнил самостоятельно. Диссертантом лично проведены эксперименты по созданию и характеристике наноконтейнеров и последующей оценке их антимикробного действия в системах *in vitro* и *in vivo* на модели нематоды. Термогравиметрический анализ и инфракрасная спектроскопия с Фурье-преобразованием для выявления эффективности загрузки куркумина в нанотрубки галлуазита выполнена совместно с профессором Джузеппе Ладзара на кафедре физической химии Университета Палермо (Италия). Просвечивающая электронная микроскопия проводилась на базе центра коллективного пользования Казанского (Приволжского) федерального университета «Аналитическая микроскопия» совместно с к.б.н. Евтюгиным В. Г. Обсуждение и подготовка материалов к публикации статей проводилось совместно с соавторами.

Связь работы с научными программами

Работа выполнена в рамках гранта РНФ 14-14-00886 (2014-2016) «Новая методология комплексной оценки токсичности наноматериалов» и Программы повышения конкурентоспособности Казанского (Приволжского) федерального университета. Работа также поддержана грантами РФФИ 17-04-02182 А (2017-2019) «Микроскопические белковые контейнеры, допированные наноглинами и функциональными полимерами, для направленной доставки гидрофобных препаратов (на примере нематоды *Caenorhabditis elegans*)»; 14-04-01474 А (2014-2016) «Функциональные наноконтейнеры на основе нанотрубок галлуазита для эффективной инкапсуляции и доставки биологических макромолекул»; 18-29-11031 мк (2018-2020) «Система доставки топических противовоспалительных препаратов на основе нанотрубок галлуазита».

Публикация результатов исследования

По результатам работы опубликовано 7 статей в международных рецензируемых журналах, включенных в базы систем цитирования Scopus и Web of Science, 1 статья в отечественном журнале, индексируемом в базе РИНЦ и 1 глава в монографии (издательство Springer).

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, выводов и списка цитированной литературы. Работа изложена на 155 страницах, содержит 46 рисунков, включает 9 таблиц. Библиография включает 241 наименование.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы и химические соединения. Нанотрубки галлуазита (Applied Minerals Inc., США), куркумин (выделенный из *Circuma longa*), декстрин (изготовленный из картофельного крахмала), фтордезоксиуридин (FUDR), 3,3'-дигексилосакарбоцианиновый йодид (DiOC6(3)), йодистый пропидий (PI), гентамицин, стрептомицин, левамизол были приобретены в компании Sigma-Aldrich. 2',7'-дихлорофлуоресцеин 3',6'-диацетат (DCFH-DA) приобретены в компании Acros Organics; питательная среда для нематод NGM (Nematode Growth Medium) приобретена в US Biological; среды для выращивания бактерий NB (Nurient Broth) и NA (Nurient Broth Agar) были приобретены в Oxoid (Thermo Scientific).

Объекты исследования и условия их культивирования. В работе использовали стрептомицин-устойчивую культуру бактерий *Escherichia coli* OP50-1, приобретенную в генетическом центре Caenorhabditis (Caenorhabditis Genetics Center, США) и продигиозин-продуцирующую культуру бактерий *Serratia marcescens* ATCC® 9986, полученную из Американской коллекции типовых культур (American type culture collection, США). Бактерии *E. coli* инкубировали при 37 °C в жидкой питательной среде NB с добавлением 50 мкг/мл антибиотика стрептомицина, бактерии *S. marcescens* выращивали при 30 °C в жидкой питательной среде NB с объемной долей глицерина 1 %. Для *in vivo* исследований использовали дикий тип свободноживущей почвенной нематоды *Caenorhabditis elegans* (N2 Bristol), приобретенный в генетическом центре Caenorhabditis (Caenorhabditis Genetics Center, США). Нематод *C. elegans* выращивали в темноте при температуре 20 °C на чашках Петри с плотной питательной средой NGM и бактериями *E. coli* OP50 в качестве пищевого источника. Для получения синхронных по возрасту нематод беременных особей обрабатывали 2 % NaOCl и 0.45 M NaOH. Вылупившихся из яиц червей личиночной стадии L1 переносили в 6-луночные планшеты со средой NGM (600 нематод/лунка), засеянные бактериями *E. coli* или *S. marcescens* в концентрации 0.3 о.е./лунка (2.2×10^9 КОЕ) и инкубировали в течение 72 часов до появления взрослых репродуктивных особей.

Синтез и характеристика наноконтейнеров из галлуазита, загруженного куркумином, и покрытого декстриновыми стопперами (галлуазит+куркумин/декстрин). Куркумин загружали в нанотрубки галлуазита с использованием метода вакуумной загрузки, после чего наносили на поверхность нанотрубок полисахаридную оболочку (рис.2). Эффективность загрузки определяли с помощью термогравиметрического анализатора Q5000 IR (TA Instruments, Италия). Инфракрасные спектры наноконтейнеров регистрировали с использованием ИК-Фурье спектрометра (Frontier, PerkinElmer, США). Высвобождение куркумина из непокрытых и покрытых декстрином нанотрубок оценивали в М9 буфере с лизированными нематодами на стадии роста L4 при pH 7.2 (6500 нематод/мл) с помощью спектрофотометра Hitachi U-5100 UV-Vis (Hitachi High Technologies, Япония). Значения дзета-потенциала и гидродинамического диаметра наноконтейнеров определяли с помощью анализатора Zetasizer Nano ZS (Malvern, Великобритания).

Микробиологические методы. Для анализа проницаемости бактериальной клеточной мембранны в 8-луночную адгезивную слайд-камеру со съемным покровным стеклом для микроскопирования Cell imaging coverglass (Eppendorf, Германия), содержащую по 500 мкл питательной среды NB с нанотрубками галлуазита или наноконтейнерами галлуазит+куркумин/декстрин (0.05, 0.25 и 0.5 мг/лунка) добавляли суспензию ночной культуры бактерий *E. coli* или *S. marcescens* с конечной концентрацией в лунке 0.02 о.е. (2.45×10^8 КОЕ). Для подсчета количества живых и мертвых клеток образцы спустя 72 часа инкубирования были окрашены в течение 5 минут красителями 0.02 мкг/мл DiOC₆(3) и 3 мкг/мл йодистого пропидия (PI). Оценку результатов витального окрашивания проводили на конфокальном микроскопе. Оценку влияния наноконтейнеров галлуазит+куркумин/декстрин на формирование биопленок бактерий *E. coli* и *S. marcescens* проводили с помощью атомно-силового микроскопа. Динамику роста микроорганизмов изучали с использованием термостатируемого планшетного спектрофотометра (Thermo Scientific Multiscan FC, США) при длине волны 595 нм. Влияние куркумин-загруженных наноконтейнеров на бактериальную подвижность *S. marcescens* оценивали методом сравнения радиусов зон перемещения обработанных и контрольных бактерий на поверхности полутвердой питательной среды (5 г/л пептон, 1% глицерин и 0.75 % агар).

Методы работы с нематодами. Для изучения антибактериального действия галлуазит+куркумин/декстрин (0.05, 0.5 и 1 мг/лунка) добавляли нематодам на стадии L1 после внесения бактериальной пищи (*E. coli* или *S. marcescens*) или на личиночной стадии L4 спустя 48 часов инкубирования с бактериями. Общее время культивирования нематод с бактериями и наноконтейнерами составило 72 часа, до достижения половозрелости. Для анализа репродуктивности нематод смывали в пробирку, фиксировали кипятком в течение 30 секунд и

подсчитывали количество яиц у беременных особей. Уровень внутриклеточных активных форм кислорода (АФК) в организме нематод определяли с использованием красителя DCFH-DA на планшетном флуориметре Tecan Infinite 200Pro (Tecan, Швейцария). Для определения уровня липофусцина нематод обездвиживали 25 мМ азидом натрия, далее получали эпифлуоресцентные изображения червей на флуоресцентном микроскопе. Для оценки бактериальной колонизации кишечника нематод, обработанных бактериями и наноконтейнерами в течение 72 часов, отмывали и обрабатывали 25 мМ левамизолом в течение 5 минут. Далее червей инкубировали в течение 2 часов в присутствии 40 мМ левамизола и 200 мкг/мл гентамицина, промывали 25 мМ левамизолом. Затем, суспензии нематод гомогенизировали стерильными пестиками Homogenizer microtube pestle (SSIbio, США). После серийных разведений лизат нематод высевали в чашки Петри с питательной средой NA с добавлением 50 мкг/мл стрептомицина для *E. coli* или с глицерин-пептонной средой (ГПС) для *S. marcescens*. Число колоний определяли спустя 48 часов инкубации при 37 °C и 30 °C для *E. coli* и *S. marcescens*, соответственно. Для анализа поглощения куркумина из наноконтейнеров тканями нематод отмывали с помощью раствора M9 и измельчали пестиками для гомогенизации. Для экстракции куркумина в полученную измельченную суспензию нематод добавляли 1 мл смеси ацетона и дистиллированной воды в соотношении 1:1. Концентрацию экстрагированного куркумина определяли с помощью спектрофотометра Hitachi U-5100 (Hitachi High Technologies, Япония) при длине волны 420 нм. Анализ продолжительности жизни нематод проводили в 96-луночных планшетах по методике [Solis *et al.*, 2011]. Синхронизированных взрослых нематод помещали в 96-луночные планшеты (10-20 червей/лунка), обрабатывали фтордезоксиуридином, добавляли галлуазит+куркумин/декстрин с бактериями *E. coli* или *S. marcescens* и в течение 27 или 25 суток, соответственно, наблюдали за жизнеспособностью. Нематоды считались мертвыми при отсутствии тактильной реакции на прикосновение тонким платиновым проводом.

Методы микроскопирования. Наблюдения за процессом развития нематод осуществляли с помощью стереомикроскопа Nikon SMZ 745 T (Nikon, Япония). Для визуализации нематод в режиме светлого или флуоресцентного поля использовали оптический микроскоп Imager Z2 (Carl Zeiss, Германия). Для подсчета живых и мертвых нематод был использован инвертированный микроскоп Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Германия). Для анализа флуоресценции использовали лазерный сканирующий конфокальный микроскоп LSM 780 (Carl Zeiss, Германия). Изображения в режиме темного поля были получены с помощью темнопольного микроскопа Olympus BX51 (Olympus, Япония), оснащенного гиперспектральной системой CytoViva (США). Просвечивающую электронную микроскопию (ПЭМ) осуществляли с использованием прибора Hitachi HT7700 Exalens (Hitachi, Япония), сканирующую электронную микроскопию осуществляли с использованием прибора Auriga CrossBeam (Carl Zeiss, Германия). Атомно-силовые изображения получены с помощью прибора Dimension Icon (Bruker, Германия).

Статистическая обработка. Статистические различия между контрольными и опытными нематодами были рассмотрены с помощью одностороннего теста ANOVA. Достоверность различий вычисляли по двустороннему критерию Даннета с 95 % доверительным интервалом и критерию Тьюки. Выживаемость червей анализировали с использованием непараметрического анализа выживаемости Каплан-Майер. Лог-ранговый тест был использован для сравнения функций выживаемости по группам и для выявления Р значений вероятности ошибки. Различия считались статистически значимыми, когда $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***)).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

1 Анализ токсичности нанотрубок галлуазита на организм нематод

Первоначально, исследовали влияние нанотрубок галлуазита на жизнедеятельность нематод *C. elegans in vivo*. Подсчет количества яиц в расчете на одну нематоду, употреблявшую в течение 72 часов нанотрубки галлуазита (0.025-0.5 мг/чашка) вместе с бактериями *E. coli*, не выявил статистически значимых различий по сравнению с контрольными животными,

питавшимися только бактериями (рис.1А). Следовательно, нанотрубки в исследуемых концентрациях не оказывают существенного влияния на репродуктивность нематод.

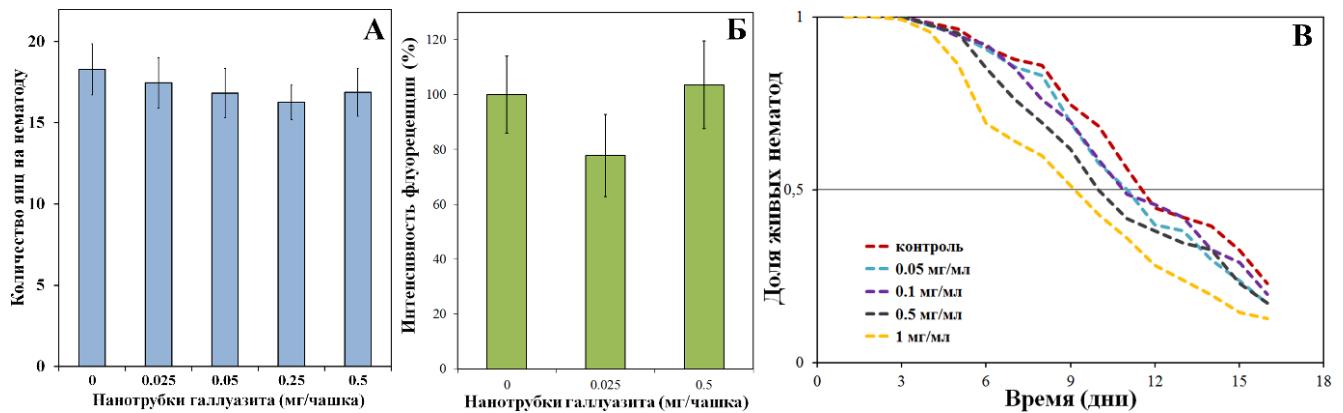


Рисунок 1. А – Распределение яиц во взрослых нематодах *C. elegans* (культивирование в течение 3 суток), накормленных бактериями *E. coli* в присутствии или в отсутствии нанотрубок галлуазита (0.025-0.5 мг/чашка) в течение 72 часов от личиночной стадии L1. Б – Накопление автофлуоресцентного липофусцина в организме нематод *C. elegans*, выращенных с бактериями *E. coli* и нанотрубками галлуазита (0.025 и 0.5 мг/чашка) в течение 72 часов. В – Кривая выживаемости нематод *C. elegans* после инкубации с бактериями *E. coli* и нанотрубками галлуазита (0.05, 0.1, 0.5, 1 мг/мл) в течение 16 суток.

Повышенный внутриклеточный уровень липофусцина связан с окислительным стрессом [Brunk *et al.*, 2002]. Была измерена флуоресценция липофусцина у нематод, накормленных в течение 72 часов нанотрубками галлуазита в самой низкой и высокой концентрациях (0.025 и 0.5 мг/чашка). Как показано на рис.1Б, при концентрации нанотрубок 0.025 мг/чашка наблюдается заметное снижение уровня липофусцина, в то время как при концентрации нанотрубок 0.5 мг/чашка интенсивность флуоресценции изменилась незначительно по сравнению с контролем. Это указывает на то, что нанотрубки галлуазита не вызывают выработку активных форм кислорода у нематод и не приводят к преждевременному старению. Проведена оценка хронического влияния нанотрубок галлуазита на продолжительность жизни нематод. Синхронизированных взрослых нематод помещали в 96-луночные планшеты (около 10-20 червей/лунка), обрабатывали фтордезоксиридином, добавляли нанотрубки галлуазита (0.05-1 мг/мл) с бактериями *E. coli* и в течение 16 суток наблюдали за жизнеспособностью. Установлено, что нанотрубки галлуазита в изученных концентрациях не оказывают отрицательного воздействия на выживаемость нематод (рис.1В). Низкие концентрации нанотрубок галлуазита (0.05, 0.1 мг/мл) не снижали продолжительности жизни нематод, тогда как более высокие концентрации (0.5, 1 мг/мл) несколько снизили среднюю продолжительность жизни (примерно на 15 % по сравнению с контролем), однако это изменение было статистически не значимым ($P>0.05$). Полученные результаты позволяют предположить, что нанотрубки галлуазита не оказывают негативного воздействия на нематод *C. elegans* и могут служить в качестве безопасных контейнеров для пероральной доставки лекарственных препаратов, в том числе гидрофобных веществ.

2 Создание и характеристика заполненных куркумином и покрытых полисахаридной оболочкой наноконтейнеров (галлуазит+куркумин/декстрин)

Для концентрирования гидрофобного куркумина в просвете нанотрубок галлуазита была использована технология вакуумной загрузки лекарств (рис.2). Загруженные куркумином нанотрубки были функционализированы с использованием декстрина для формирования стопперов, которые обеспечивают длительное высвобождение лекарства в цитоплазме клеток. Деградация данных декстриновых стопперов осуществляется под действием внутриклеточных гликозид-гидролаз. [Dzamukova *et al.*, 2015]. Полученные наноконтейнеры на основе нанотрубок галлуазита, заполненные куркумином и покрытые декстриновыми стопперами

(галлуазит+куркумин/декстрин) легко сусpendingируют в воде, без образования агрегатов и стабильны в течение нескольких недель. Куркумин, загруженный в галлуазит, придает нанотрубкам характерный желтый цвет по сравнению с необработанными нанотрубками.



Рисунок 2. Схематическое изображение процедуры загрузки куркумина в полость нанотрубок с последующим покрытием декстриновой оболочкой. (галлуазит+куркумин) – галлуазит, загруженный куркумином; (галлуазит+куркумин/декстрин) – галлуазит, загруженный куркумином и покрытый декстрином.

Морфологию наноконтейнеров исследовали при помощи СЭМ, ПЭМ и АСМ. Было установлено, что галлуазит сохраняет свое первоначальное трубчатое строение после заполнения куркумином и модификации декстриновой пленкой (рис.3А-В). Изображения, полученные с помощью ПЭМ, позволили выявить присутствие загруженного куркумина в просвете нанотрубок галлуазита (рис.3А-В). На изображениях СЭМ видно, что гладкая и однородная наружная поверхность нанотрубок галлуазита после загрузки куркумином становится шероховатой (рис.3Г-Е). Покрытие декстрином нанотрубок галлуазита, содержащих куркумин, привело к формированию физически-адсорбированного декстринового слоя на поверхности галлуазита. Такие декстриновые заглушки на концах нанотрубок отчетливо видны на изображениях, полученных при помощи СЭМ и АСМ (рис.3). С использованием методов динамического светорассеяния и лазерной Допплеровской велосиметрии изучены гидродинамические размеры и дзета-потенциал галлуазита (чистого и загруженного куркумином). Измеренные значения дзета-потенциала показывают, что все образцы обладают коллоидной стабильностью (рис. 4А). Средний гидродинамический размер нанотрубок галлуазита после загрузки куркумином изменился незначительно (446.5 ± 2.8 нм для необработанного галлуазита, 435.7 ± 11.8 нм для загруженного куркумином галлуазита). Однако после покрытия декстриновыми стопперами средний размер наноконтейнеров составил 362 ± 14.5 нм (рис.4Б). Вероятно, это связано с тем, что декстриновые заглушки на концах нанотрубок уменьшают их агрегацию и улучшают дисперсность наноконтейнеров.

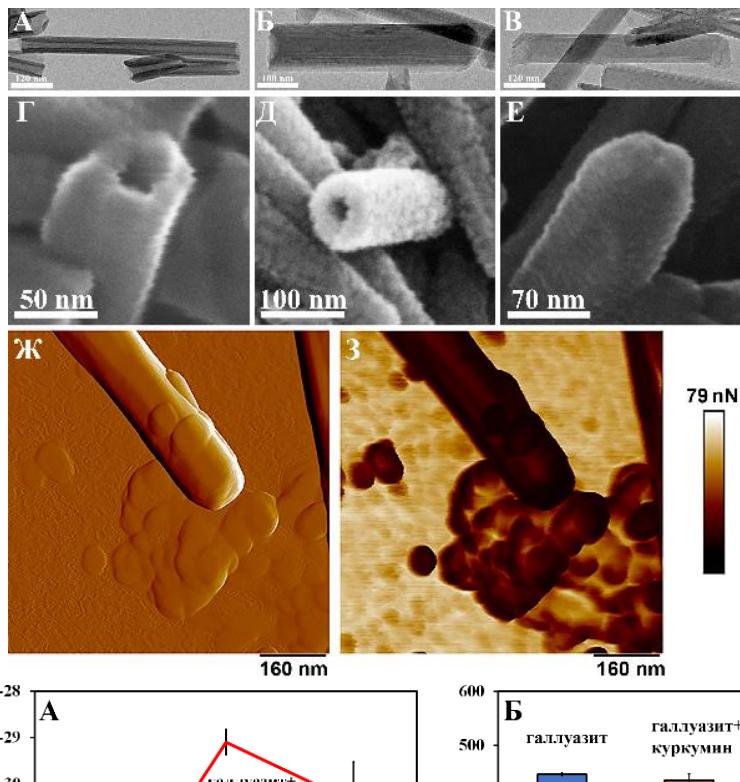


Рисунок 3. Просвечивающие (верхний ряд) и сканирующие (средний ряд) электронные микрофотографии необработанных (**А, Г**), загруженных куркумином без (**Б, Д**) или с (**В, Е**) дексстриновыми заглушками нанотрубок галлуазита. Атомно-силовые изображения заполненных куркумином и покрытых дексстриновой оболочкой нанотрубок галлуазита, полученные в режимах *Peak Force Error* (**Ж**) и неспецифической адгезии (**З**).

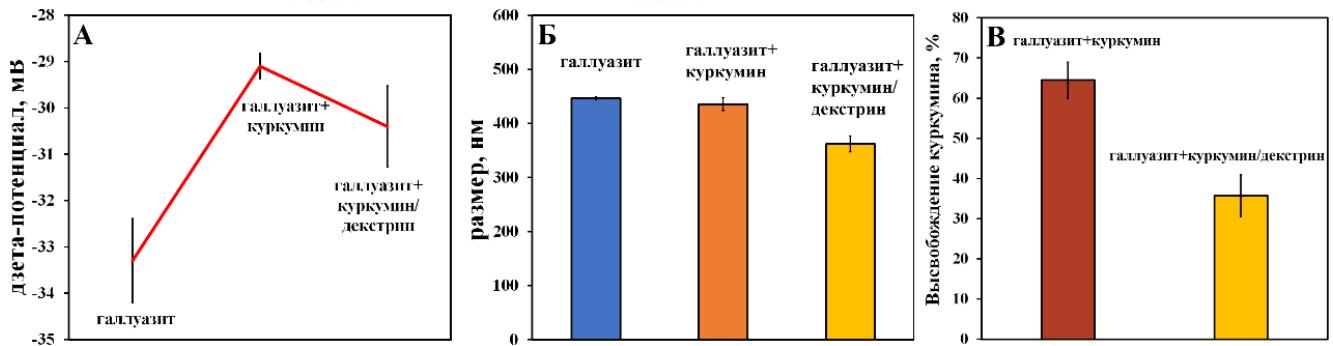


Рисунок 4. Значения дзета-потенциала (**А**) и гидродинамического диаметра (**Б**) нанотрубок галлуазита и наноконтейнеров, загруженных куркумином и покрытых или не покрытых дексстрином (галлуазит+куркумин/дексстрин и галлуазит+куркумин, соответственно). Высвобождение куркумина из нанотрубок галлуазита, покрытых дексстрином и без дексстрина, супензированных в лизате из нематод *C. elegans* pH 7.1 после 48 часов инкубирования (**В**).

Релиз (высвобождение) куркумина из наноконтейнеров оценивали с использованием спектрофотометрии. Определен устойчивый выход куркумина $64.5 \pm 4.5\%$ (по массе) из немодифицированного дексстрином галлуазита за 48 часов (рис.4В). Дексстриновые стопперы уменьшают выход куркумина примерно в два раза ($35.7 \pm 5.2\%$ по массе) по сравнению с непокрытыми трубками, что позволяет увеличить количество доставляемого лекарственного вещества. Эффективность загрузки куркумина исследовали с использованием ряда физико-химических методов. На рис.5А представлены ИК-Фурье спектры чистого куркумина, галлуазита и галлуазита, загруженного куркумином. Инфракрасные спектры загруженного куркумином галлуазита четко показывают одновременное присутствие полос поглощения, характерных для молекул нанотрубок галлуазита и куркумина, что подтверждает их взаимодействие. Использование термогравиметрического анализа (ТГА) позволило определить эффективность загрузки куркумина в нанотрубки галлуазита (рис.5Б). Количество куркумина в композите количественно определяли по правилу смесей для деградированных соединений при 700°C [Cavallaro *et al.*, 2017]. Эффективность загрузки составила $18.3 \pm 0.27\%$ по массе, это значение превышает объем внутреннего пространства нанотрубки. Вероятно, препарат, распределен внутри основной полости трубок, во внешних порах, образованных алюмосиликатными слоями и на поверхности нанотрубок. Полученные результаты можно объяснить тем, что внутреннее пространство галлуазита образовано положительно заряженным оксидом алюминия, облегчающим адсорбцию отрицательно заряженного раствора куркумина.

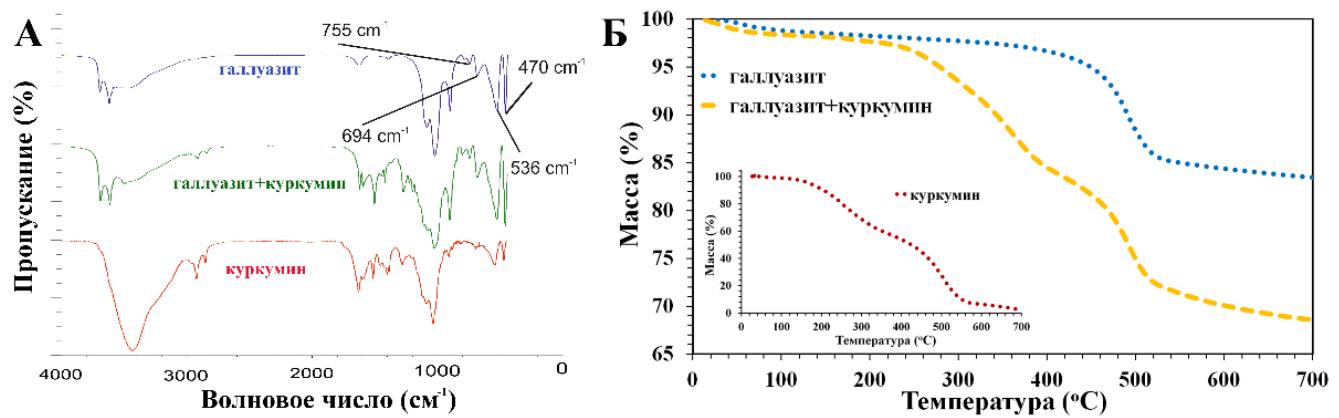


Рисунок 5. А – Инфракрасные спектры с Фурье преобразованием нанотрубок галлуазита, куркумина и заполненных куркумином нанотрубок галлуазита. Б – Термогравиметрические кривые, соответствующие термальным потерям веса куркумина, нанотрубок галлуазита и заполненных куркумином нанотрубок галлуазита.

3 Антибактериальная активность загруженных куркумином галлуазитных наноконтейнеров в системе *in vitro*

Антибактериальное влияние наноконтейнеров галлуазит+куркумин/декстрин сначала было изучено в условиях *in vitro* с использованием чистых микробных культур *Escherichia coli* OP50-1 и *Serratia marcescens* ATCC® 9986. Нарушение целостности стенок клеточной мембрany является ключевым механизмом, приводящим к гибели микроорганизмов [Tyagi *et al.*, 2015]. Целостность мембран и тем самым жизнеспособность бактерий визуализировали с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии с использованием флуоресцентных красителей PI (для мертвых клеток) и DiOC6(3) (для живых клеток). Подсчет жизнеспособных и мертвых бактерий выявил концентрация-зависимое увеличение гибели бактерий, обработанных куркумин-загруженными и покрытыми декстриновой оболочкой наноконтейнерами. При максимальной тестируемой концентрации (0.5 мг/лунка) количество мертвых бактерий *E. coli* составило 26.3 %, что в 2.4 раза больше, чем в контрольном образце (11 %). Наноконтейнеры с той же концентрацией вызвали значительное повреждение целостности мембран бактерий *S. marcescens* с 67 % летальностью, что в 4 раза больше, по сравнению с показателем отрицательного контроля (16.6 %). Следовательно, наноконтейнеры в концентрации 0.5 мг/лунка приводят к гибели *S. marcescens* в 2.5 раза эффективнее, чем по сравнению с *E. coli* (рис.6А). Флуоресцентные изображения, показывающие жизнеспособность бактерий *E. coli* и *S. marcescens*, обработанных наноконтейнерами или нанотрубками галлуазита (0.5 мг/лунка), представлены на рис.6Б.

Влияние наноконтейнеров, загруженных куркумином (0.1 и 0.2 мг/лунка), и необработанных нанотрубок галлуазита (0.1 и 0.2 мг/лунка) на рост бактерий *E. coli* и *S. marcescens* определяли путем измерений оптической плотности клеток при 595 нм (ОП 595) в течение 48 часов (рис.7). Кривые роста показывают, что содержащие куркумин наноконтейнеры галлуазит+куркумин/декстрин значительно сильнее подавляют рост бактерий вида *S. marcescens*, по сравнению с *E. coli*. Наноконтейнеры в концентрации 0.1 и 0.2 мг/лунка, начиная с 9 часов инкубации, индуцировали снижение роста клеток *S. marcescens* на 44.1 % и 58.2 %, соответственно (рис.7Б). Рост бактерии *E. coli*, инкубированные с наноконтейнерами в аналогичных условиях, ингибировался значительно меньше, 20.4 % (0.1 мг/лунка) и 34.2 % (0.2 мг/лунка), соответственно (рис.7А).

Влияние наноконтейнеров галлуазит+куркумин/декстрин на формирование биопленок *E. coli* и *S. marcescens* изучали с помощью атомно-силовой микроскопии (ACM). ACM-изображения показывают, что обработка куркумин-загруженными наноконтейнерами приводит к эффективному ингибированию образования биопленок у исследуемых бактерий (рис.8). Обработанные наноконтейнерами (0.05 и 0.25 мг/лунка) бактерии *S. marcescens* образовывали островковые кластеры клеток (рис.8Б). Высокая концентрация наноконтейнеров (0.5 мг/лунка)

серьезно ингибитирует процесс формирования биопленок, в связи с чем плотность клеток на поверхности субстрата была значительно ниже в сравнении с необработанными клетками. При обработке бактерий *E. coli* наноконтейнерами в концентрации 0.05 мг/лунка клетки сохраняют способность к формированию многослойной биопленки, несмотря на снижение плотности клеток. При более высоких концентрациях наноконтейнеров (0.25 и 0.5 мг/лунка), загруженных куркумином, визуализируются только отдельные скопления клеток (рис.8А).

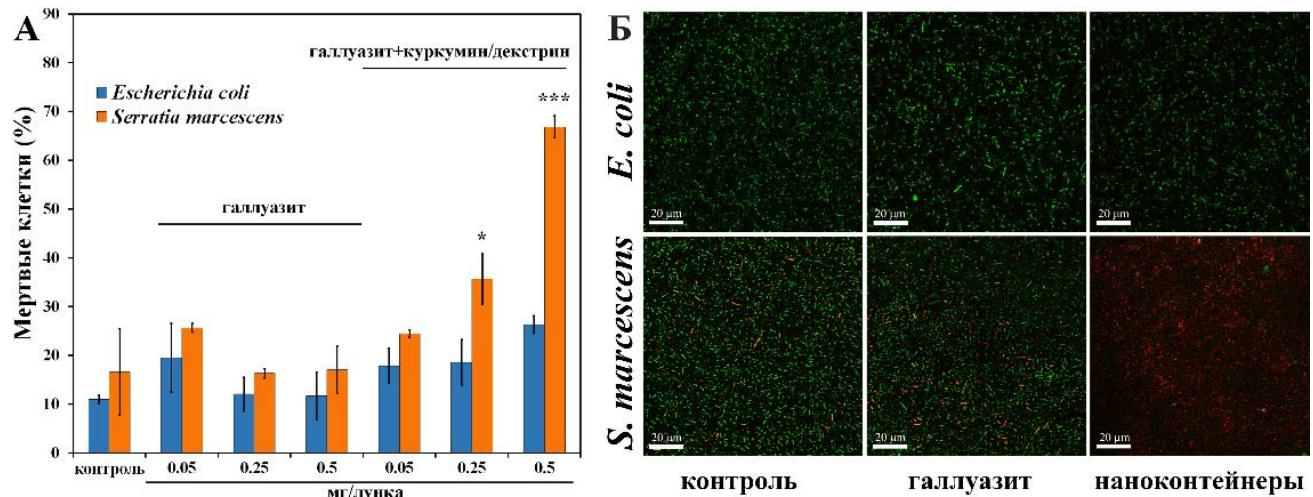


Рисунок 6. **А** – Влияние нанотрубок галлуазита и загруженных куркумином и покрытых декстрином наноконтейнеров (галлуазит+куркумин/декстрин) на гибель клеток *E. coli* и *S. marcescens*. **Б** – Изображения конфокальной сканирующей микроскопии клеток *E. coli* (верхний ряд) или *S. marcescens* (нижний ряд), выращенных в течение 72 часов на адгезивных слайд-камерах в отсутствии (контроль) или в присутствии нанотрубок галлуазита (0.5 мг/лунка) или наноконтейнеров галлуазит+куркумин/декстрин (0.5 мг/лунка). Зеленая флуоресценция (*DiOC6(3)*) показывает жизнеспособные бактерии, красная флуоресценция (йодистый пропидий) отображает мертвые клетки.

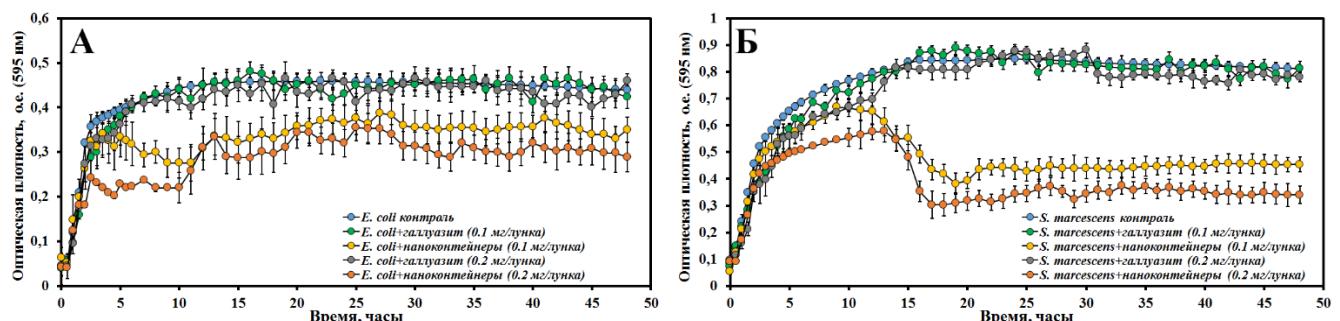


Рисунок 7. Кривые роста бактерий *E. coli* (А) и *S. marcescens* (Б), инкубированных в течение 48 часов в жидкой среде без добавления или с добавлением нанотрубок галлуазита или наноконтейнеров (галлуазит+куркумин/декстрин) в концентрации 0.1 и 0.2 мг/лунка. Рост бактерий оценивали измерением оптической плотности при $\lambda=595$ нм в указанные моменты времени. Данные приведены в средних значениях \pm стандартная ошибка.

Поскольку механизм «Чувство кворума» - Quorum Sensing (QS) играет жизненно важную роль в регулировании формирования биопленок [Rasamiravaka *et al.*, 2015], то значительное отрицательное влияние наноконтейнеров, загруженных куркумином, на образование биопленок *E. coli* и *S. marcescens* можно объяснить тем, что куркумин обладает анти-QS активностью [Packiavathy *et al.*, 2014; Bouyahya *et al.*, 2017]. Массовое перемещение клеток по типу роения представляет собой важный фактор вирулентности бактерий *Serratia marcescens*, поскольку оно вовлечено в процесс формирования биопленок [Packiavathy *et al.*, 2014; Bakkiyraj *et al.*, 2012]. Как показано на рис.9А, куркумин-загруженные наноконтейнеры (0.25 мг/мл) ингибируют QS-регулируемое продвижение тестируемого штамма *S. marcescens* по агаризованной среде в отличии от чистых нанотрубок галлуазита (0.25 мг/мл) и отрицательного контроля. Так как синтез

продигиозина является QS-регулируемым вирулентным фактором [Ramanathan *et al.*, 2018], в работе была изучена способность наноконтейнеров, загруженных куркумином, к подавлению продуцирования продигиозина у бактерий *S. marcescens*. Установлено, что инкубация бактерий *S. marcescens* в течение 24 часов в агаризованной среде с куркумин-загруженными наноконтейнерами (0.5 мг/лунка) приводит к ингибированию синтеза продигиозина (рис. 9Б).

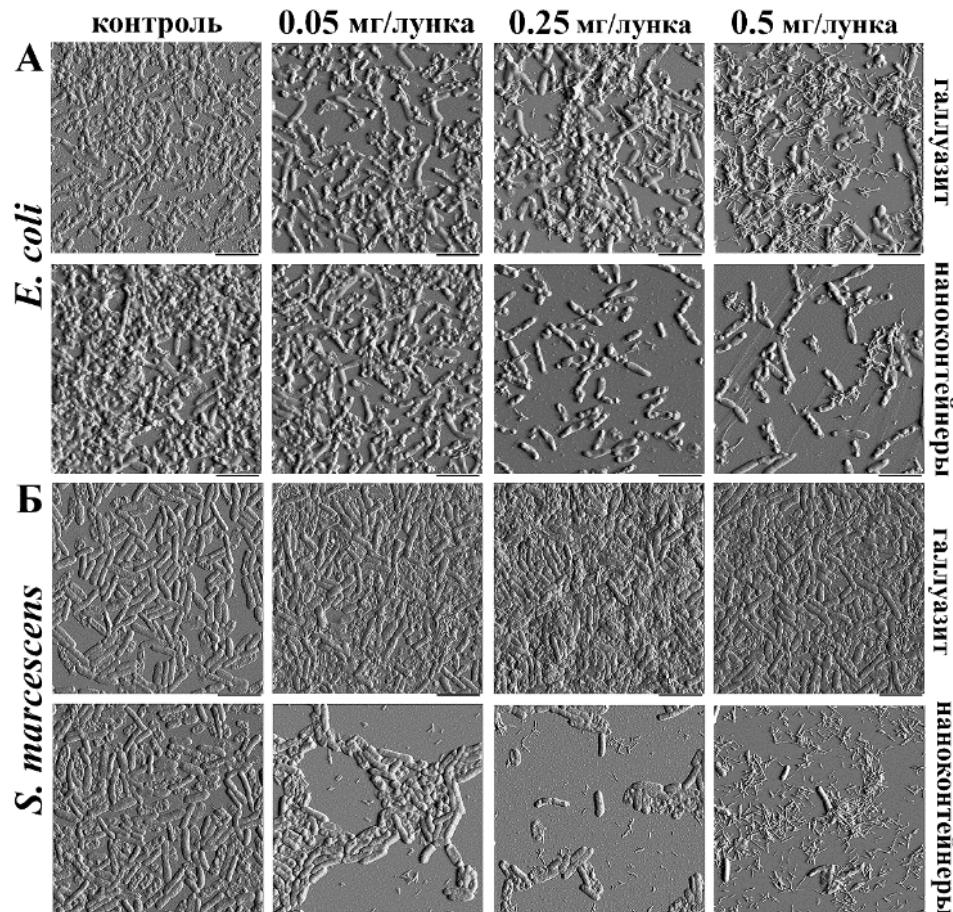


Рисунок 8. Атомно-силовые изображения биопленок *E. coli* (A) and *S. marcescens* (Б), выращенных в отсутствии (контроль) или в присутствии куркумин-загруженных наноконтейнеров с декстриновыми стопперами и нанотрубок галлуазита (концентрации указаны на рисунке). Изображения получены в режиме Peak Force Error. Шкала размера 4 мкм.

При инкубировании бактерий с чистыми нанотрубками галлуазита выработка продигиозина не подавляется (рис.9Б). Следовательно, ингибирование наноконтейнерами, загруженными куркумином, QS-регулируемого синтеза продигиозина и подвижности по типу роения свидетельствует об антипатогенном потенциале галлуазит+куркумин/декстрина. Таким образом, полученные результаты подтверждают, что высвобождающийся из наноконтейнеров куркумин проявляет значительное антибактериальное действие по отношению к бактериям *S. marcescens*, подавляя рост клеток и QS систему, в то время как клетки *E. coli* не подвержены такому сильному влиянию куркумина. В ряде исследований было показано, что бактерии *S. marcescens* обладают повышенной гидрофобностью клеточной поверхности по сравнению с *E. coli* [Ashkenazi *et al.*, 1986; Rosenberg *et al.*, 1986; Ness-Greenstein *et al.*, 1995; Hejazi *et al.*, 1997]. Поскольку куркумин является гидрофобным соединением, то способен легче связываться с гидрофобной поверхностью клеток *S. marcescens*, вероятно, легче проникает внутрь бактерий и негативно воздействует на их жизнеспособность. Можно предположить, что наноконтейнеры галлуазит+куркумин/декстрины могут быть использованы в системе *in vivo* на нематодах *C. elegans* для изучения специфического противомикробного действия куркумина в отношении патогенной *S. marcescens* на модели нематоды.



Рисунок 9. Продвижение *S. marcescens* по типу роения в контрольных условиях или в присутствии нанотрубок галлуазита или куркумин-загруженных и покрытых декстриновыми стопперами наноконтейнеров в концентрации 0.25 мг/мл (А). Влияние нанотрубок галлуазита и наноконтейнеров в концентрации 0.5 мг/лунка на синтез продигиозина клетками *S. marcescens* после 24 часов инкубации (Б). Контроль – необработанные бактерии.

4 Антибактериальная активность загруженных куркумином галлуазитных наноконтейнеров в системе *in vivo*

4.1 Анализ влияния чистого куркумина на организм нематод

До оценки влияния наноконтейнеров галлуазит+куркумин/декстрины *in vivo*, было изучено воздействие чистого куркумина (0.1, 1, 2 и 6 мг/мл) на организм нематод. Для растворения куркумина использовали 70 мМ гидроксид натрия, разбавленный в фосфатно-солевом буфере Дульбекко (DPBS). На рис.10 представлены микрофотографии отделов кишечника нематод, выращенных в среде с куркумином концентрации 0.015 мг/чашка (0.1 мг/мл). Куркумин накапливается в виде плотных коричнево-желтых скоплений по всему кишечнику нематод без перемещения в соседние ткани. Заполнение пищеварительной системы нематод скоплениями куркумина может привести к расширению просвета кишечника и причинить вред структуре микроворсинок.



Рисунок 10. Микрофотографии кишечника нематод *C. elegans* после употребления в течение 72 часов 0.015 мг/чашка куркумина: передняя кишка (А), средний отдел кишки (Б), хвостовой отдел (В).

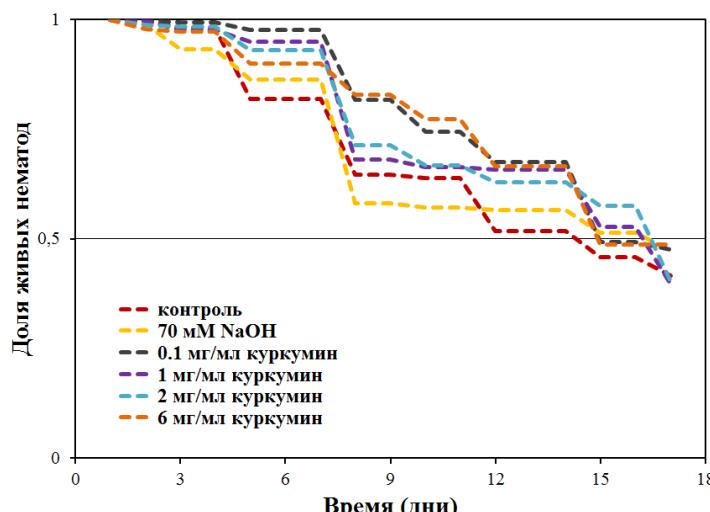


Рисунок 11. Выживаемость нематод после кормления в течение 17 суток куркумином разной концентрации (0.1-6 мг/мл) и бактериями *E. coli*.

Таблица 1 – Выживаемость нематод после инкубации с куркумином (0.1-6 мг/мл) и бактериями *E. coli* в течение 17 суток.

Концентрация вещества мг/мл (мкг/лунка)	Общее количество нематод	Средняя продолжительность жизни±Стандартная ошибка	Изменение относительно контроля, дни (%)	Вероятность ошибки относительно контроля (логранговый критерий)
контроль	288	12.46 ± 0.29		
0.1 куркумин (6.25)	305	14.05 ± 0.22	1.588 (12.75)	0.0088
1 куркумин (62.5)	292	13.51 ± 0.26	1.056 (8.48)	0.3897
2 куркумин (125)	261	13.54 ± 0.28	1.086 (8.72)	0.3954
6 куркумин (375)	287	12.82 ± 0.21	0.0364 (2.92)	0.0133
70 мМ NaOH	306	12.47 ± 0.30	0.013 (0.1)	0.249

Анализ продолжительности жизни нематод, выращенных в присутствии куркумина или гидроксида натрия, проводили в течение 17 суток (рис.11). У нематод, обработанных куркумином наблюдалось увеличение продолжительности жизни. Значительное увеличение продолжительности жизни, на 12.75 % было у животных, употреблявших 0.1 мг/мл куркумин (таблица 1).

4.2 Влияние наноконтейнеров на микрофлору нематод *C. elegans*

Известно, что условно-патогенные для человека бактерии *S. marcescens* способны инфицировать свободноживущих нематод *C. elegans* и приводить к их гибели в течение нескольких дней [Kurz *et al.*, 2003; Mallo *et al.*, 2002]. Накопление и размножение большого количества непереваренных клеток в просвете пищеварительного тракта нематод приводит к прогрессирующему растяжению кишечника (рис.12Г). У некоторых червей в наших экспериментах наблюдались обширные повреждения кишечника и деструкция тканей после инкубации с бактериями *S. marcescens* (рис.12А,Г). Помимо кишечной колонизации бактерии *S. marcescens* способны прикрепляться к кутикуле и образовывать на ее поверхности скопления (рис.12Б,В). Так как загруженные куркумином галлуазитные наноконтейнеры ингибируют в системе *in vitro* жизнеспособность, вирулентные факторы патогенности и пролиферацию бактерий *S. marcescens*, можно предположить, что инкубирование *C. elegans* в присутствии наноконтейнеров могло бы устраниить патогенность этих бактерий, не влияя на нормальную микробную флору *E. coli* в организме нематод. Полость кишечника нематод, инкубированных в течение 72 часов в присутствии бактерий *S. marcescens* и наноконтейнеров, не расширена и не окрашена в розовый цвет, в отличие от контрольных групп червей, накормленных только бактериями *S. marcescens* (рис.13А,Б). Следовательно, наноконтейнеры, загруженные куркумином, ингибируют выработку бактериями *S. marcescens* красного пигмента продигиозина не только *in vitro*, но и в организме нематод (рис.13Б). Известно, что куркумин обладает ограниченной биодоступностью и слабо всасывается клетками кишечника [Anand *et al.*, 2006; Xue *et al.*, 2017]. Полученные результаты подтвердили, что чистый куркумин сильно агрегирует в пищеварительном тракте нематод и плохо поглощается клетками кишечника (рис.10). Использованные наноносители из нанотрубок галлуазита с декстриновыми стопперами облегчили доставку куркумина в организм нематод. Как показано на рис.13Б ткани нематод окрашены в желтый цвет вследствие выхода куркумина из нанотрубок галлуазита в пищеварительном тракте и последующей адсорбции полифенольного соединения клетками кишечника. Была определена средняя концентрация куркумина в организме нематод *C. elegans* спустя 24 и 72 часа обработки 0.5 мг/лунка наноконтейнерами галлуазит+куркумин/декстрин, которая составила 4.4±0.2 и 5.9±0.3 нг/нематода, употреблявших *E. coli* или 4.2±0.2 и 6.1±0.3 нг/нематода, обработанных *S. marcescens* (рис.13В). Для характеристики пищеварения у нематод, обработанных в течение 72 часов куркумин-загруженными наноконейнерами, был проведен подсчет количества колониеобразующих единиц (КОЕ) бактерий *E. coli* и *S. marcescens*,

выделенных из кишечника *C. elegans* (рис.14). Было обнаружено небольшое количество кишечных бактерий (23 ± 1.2 КОЕ/червь) у нематод, употреблявших обычную пищу *E. coli*, свидетельствующее, что основная часть бактерий была переварена в кишечнике. В организме нематод, инфицированных бактериями *S. marcescens*, накапливается большее количество непереваренных бактерий (3280 ± 156 КОЕ/червь), подтверждающее существенную колонизацию просвета кишечника хозяина.

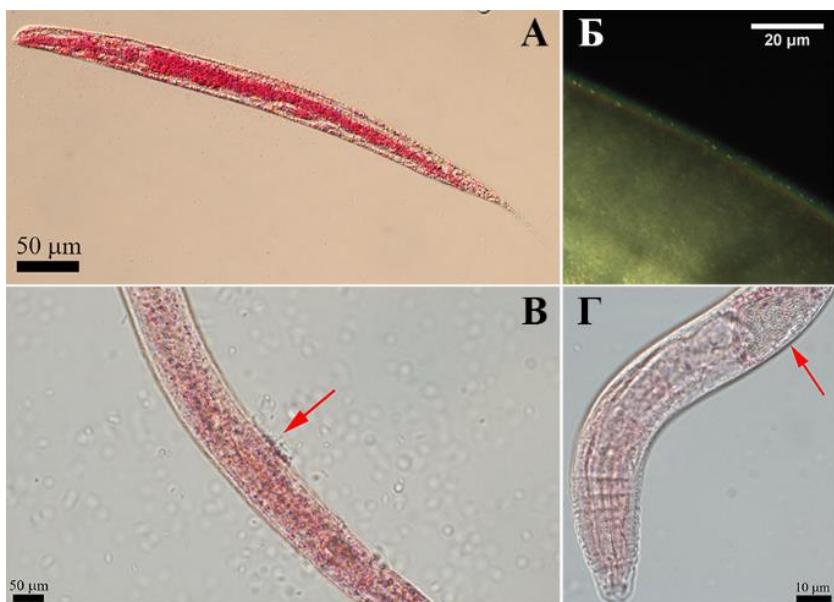


Рисунок 12. Микрофотографии нематод *C. elegans* после инфицирования бактериями *S. marcescens*. Деградация тканей нематод после инкубации с бактериями *S. marcescens* (A). Прикрепление бактерий *S. marcescens* к кутикуле нематоды (Б, В). Стрелки указывают на колонизированные участки кутикулы нематоды (В) и растяжение кишечника нематоды вследствие скопления массы бактерий *S. marcescens* (Г).

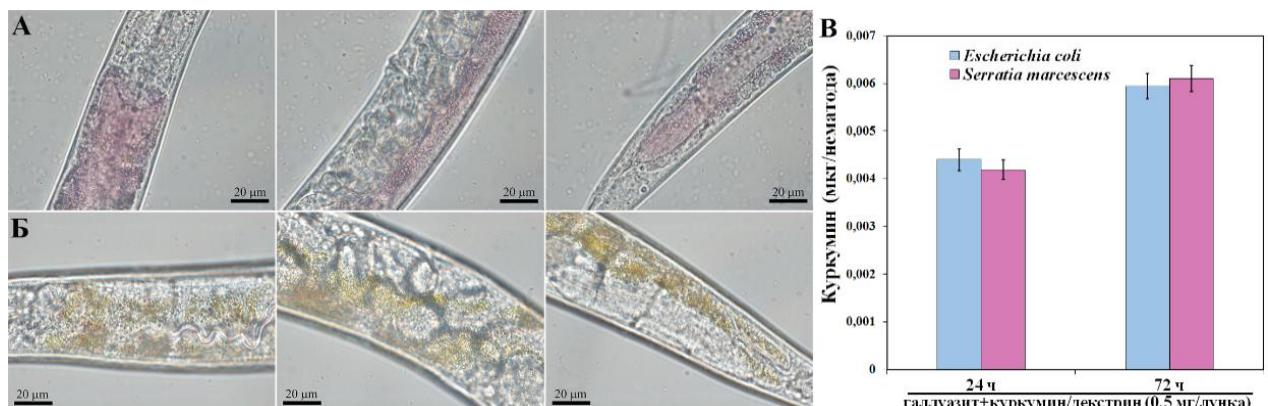


Рисунок 13. Кишечник нематод *C. elegans* после инкубирования (72 часа) с бактериями *S. marcescens* в отсутствии (А) или в присутствии наноконтейнеров галлуазит+куркумин/декстрин в концентрации 0.5 мг/лунка (Б). Оптическое поглощение куркумина тканями нематод *C. elegans* (В). Куркумин экстрагировали из нематод (~600) после обработки 0.5 мг/лунка наноконтейнерами галлуазит+куркумин/декстрин в течение 24 часов (с личиночной стадии L4) или в течение 72 часов (с личиночной стадии L1). Нематоды, обработанные чистым галлуазитом, использовали в качестве контроля.

При обработке нематод (72 часа), загруженными куркумином наноконтейнерами (0.05 и 0.5 мг/лунка), количество КОЕ *E. coli* снизилось, но незначительно по сравнению с контролем. Подсчет кишечных бактерий *S. marcescens* показал, что воздействие наноконтейнерами в концентрации 0.5 мг/лунка существенное (~2 раза) сократило концентрацию живых бактериальных клеток в кишечнике нематод (1830 ± 53 КОЕ/нематода), по сравнению с меньшей концентрацией (3253 ± 49 КОЕ/нематода). Следовательно, наноконтейнеры галлуазит+куркумин/декстрин подавляют рост патогенной *S. marcescens*, обитающей в кишечнике нематод, повышая активность пищеварения.

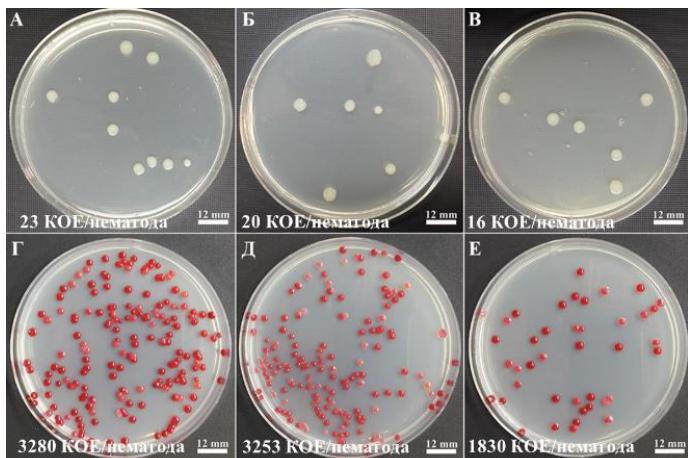


Рисунок 14. Определение количества колониеобразующих единиц бактерий *E. coli* (верхний ряд), *S. marcescens* (нижний ряд) в организме нематод *C. elegans* после инкубирования в отсутствии (**A, Г**) или в присутствии наноконтейнеров галлуазит+куркумин/декстрин в концентрации 0.05 мг/лунка (**B, Д**) и 0.5 мг/лунка (**C, Е**).

4.3 Влияние наноконтейнеров на интегральные биологические параметры нематод *C. elegans*

После определения антимикробного действия наноконтейнеров галлуазит+куркумин/декстрин в отношении *S. marcescens*, было исследовано влияние наноконтейнеров на интегральные биологические параметры нематод *C. elegans*. Обработка нематод загруженными куркумином наноконтейнерами в течение 72 часов (со стадии L1) способствовала небольшому увеличению репродуктивной способности как при кормлении бактериями *E. coli*, так и бактериями *S. marcescens* (рис. 15А). Вероятно, повышение fertильности нематод связано с пищеварение-стимулирующим действием куркумина, высвобождаемого из наноконтейнеров.

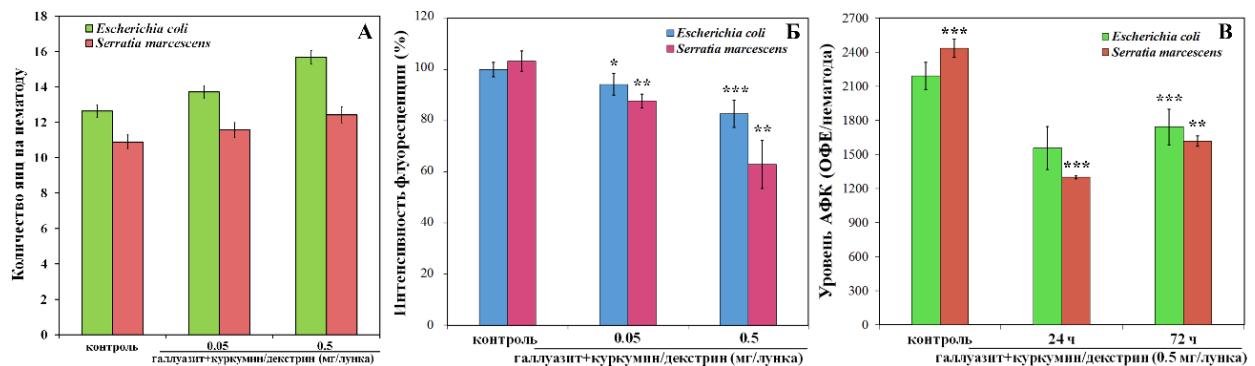


Рисунок 15. **А** – Распределение яиц во взрослых нематодах *C. elegans* (культтивирование в течение 3 суток), накормленных бактериями *E. coli* или *S. marcescens* и обработанных в течение 72 часов наноконтейнерами галлуазит+куркумин/декстрин (0.05 и 0.5 мг/лунка). **Б** – Накопление липофусцина в организме нематод *C. elegans*, выращенных с бактериями *E. coli* или *S. marcescens* в присутствии наноконтейнеров галлуазит+куркумин/декстрин (0.05 и 0.5 мг/лунка) в течение 72 часов. **В** – Внутриклеточное накопление АФК у нематод *C. elegans*, выращенных с бактериями *E. coli* или *S. marcescens* и наноконтейнерами (0.5 мг/лунка) в течение 24 или 72 часов. Уровень АФК был измерен с помощью красителя DCFH-DA. Результаты представлены в относительных флуоресцентных единицах (ОФЕ) отдельной нематоды.

Известно, что куркумин обладает антиоксидантными свойствами [Yu *et al.*, 2014; Calabrese *et al.*, 2008], поэтому положительные эффекты наноконтейнеров, загруженных куркумином, на состояние организма нематод *C. elegans*, могут зависеть от снижения окислительного стресса. Первоначально была измерена интенсивность флуоресценции липофусцина у нематод, инкубированных в течение 72 часов от стадии L1 бактериями *E. coli* или *S. marcescens* и наноконтейнерами галлуазит+куркумин/декстрин (0.05 и 0.5 мг/лунка). Установлено, что наноконтейнеры, загруженные куркумином, в зависимости от концентрации снижают уровень липофусцина (рис. 15Б). Следует отметить, что куркумин, высвобождаемый из наноконтейнеров и потребляемый нематодами, в основном снижал накопление липофусцина у

нематод, питавшихся бактериями *S. marcescens*, в то время как воздействие на животных, употреблявших *E. coli*, было менее выраженным. Куркумин, высвобождаемый из наноконтейнеров, заметно снизил накопление липофусцина у нематод, питавшихся *S. marcescens* (41 %), тогда как влияние на животных, выращенных с *E. coli*, было менее выраженным (17 %). Накопление меньшего количества липофусцина в организме нематод обусловлено снижением выработки АФК [Chávez *et al.*, 2007]. Для подтверждения этого была определена продукция АФК у взрослых нематод, обработанных в течение 24 часов или 72 часов наноконтейнерами концентрации 0.5 мг/лунка (Рис.15В). Уровень АФК определяли с использованием красителя 2',7'-дихлорофлуоресцеин 3',6'-диацетат (DCFH-DA). Как показано на рис.15В необработанные наноконтейнерами нематоды при инфицировании бактериями *S. marcescens* вырабатывали больше внутриклеточных АФК по сравнению с *C. elegans*, которые употребляли в качестве пищи бактерии *E. coli*. Известно, что увеличение АФК приводит к окислительному стрессу и, тем самым, к ускоренной гибели нематод при выращивании с патогенными бактериями [JebaMercy *et al.*, 2015]. Обнаружено, что уровень АФК значительно уменьшился после 24-часовой и 72-часовой обработки червей наноконтейнерами (рис.15В), что свидетельствует о проявлении антиоксидантной активности куркумина в организме *C. elegans*. Интересно, что кратковременная экспозиция (24 часа) наноконтейнерами снизила уровень АФК у нематод, потреблявших *S. marcescens*, в большей степени (на 47 %), чем пролонгированная экспозиция (72 часа) в присутствии *S. marcescens* (на 34 %) или *E. coli* (на 21 %) по сравнению с контрольными образцами. Такой эффект может быть связан со снижением механического раздражения кишечника галлуазитом. Таким образом, полученные результаты подтверждают, что куркумин-загруженные наноконтейнеры снижают окислительный стресс в организме нематод, что в свою очередь может привести к увеличению жизнеспособности нематод.

Изучено хроническое воздействие наноконтейнеров галлуазит+куркумин/декстрин (0.05, 0.5, 1 мг/мл) на продолжительность жизни нематод, инкубированных совместно с бактериями *E. coli* или патогенными *S. marcescens*. Средняя выживаемость контрольных нематод, выращенных в стандартных лабораторных условиях при 20 °C на источнике пищи *E. coli*, составила 14.8 ± 0.5 суток (рис.16А).

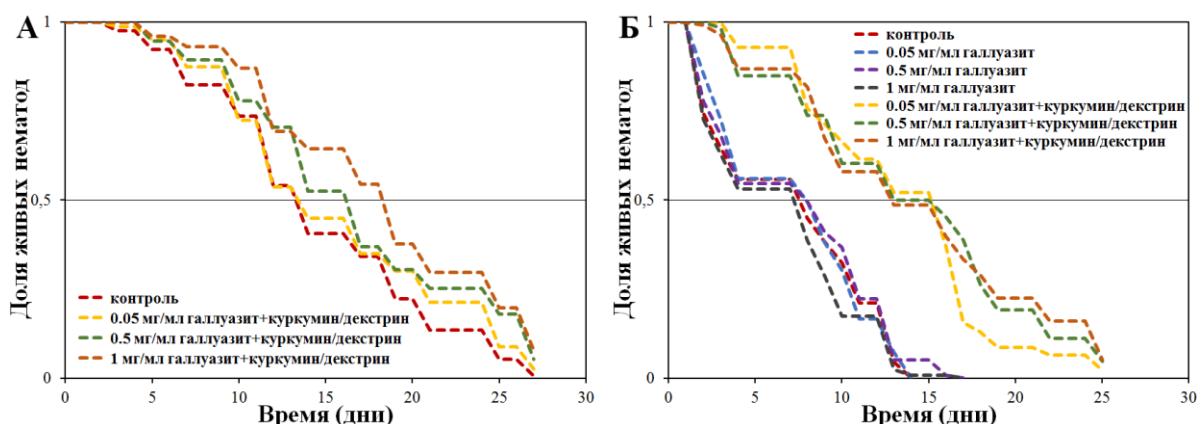


Рисунок 16. Выживаемость нематод *C. elegans* после инкубации с наноконтейнерами галлуазит+куркумин/декстрин (0.05, 0.5, 1 мг/мл) и бактериями *E. coli* (A) или *S. marcescens* (Б) в течение 27 или 25 суток, соответственно.

Средняя продолжительность жизни червей, выращенных в присутствии *S. marcescens*, была в 2 раза меньше (7.3 ± 0.3 суток) по сравнению с контролем (*E. coli*) (рис.16Б). Такая низкая выживаемость нематод связана с тем, что бактерии *S. marcescens* колонизируют кишечник нематод, что приводит к системной инфекции, которая убивает *C. elegans* [Kurz *et al.*, 2000; Mallo *et al.*, 2002; Schulenburg *et al.*, 2004], также с помощью различных мутантов *S. marcescens* были идентифицированы некоторые факторы, способствующие патогенезу в модельном организме хозяина *C. elegans* [Kurz *et al.*, 2003]. У нематод *C. elegans* после воздействия галлуазит+куркумин/декстрин наблюдалось статистически значимое увеличение

продолжительности жизни относительно контроля. Низкие концентрации наноконтейнеров 0.05 мг/мл и 0.5 мг/мл продлили среднюю выживаемость нематод, инкубированных с бактериями *E. coli*, на 15.5 % ($P=0.0076$) и 13.5 % ($P=0.0045$), соответственно, тогда как более высокая концентрация (1 мг/мл) существенно увеличила выживаемость на 23 % ($P<0.0001$) (таблица 2).

Таблица 2 – Выживаемость нематод после инкубации с наноконтейнерами галлуазит+куркумин/декстрин (0.05, 0.5, 1 мг/мл) и бактериями *E. coli* в течение 27 суток.

Концентрация вещества мг/мл (мкг/лунка)	Общее количество нематод	Средняя продолжительность жизни±Стандартная ошибка	Изменение относительно контроля, дни (%)	Вероятность ошибки относительно контроля (логранговый критерий)
контроль (<i>E. coli</i>)	170	14.8 ± 0.49		
1 наноконтейнеры (62.5)	101	18.2 ± 0.66	3.4 (23)	< 0.0001
0.5 наноконтейнеры (31.25)	95	16.8 ± 0.70	2 (13.5)	0.004467931
0.05 наноконтейнеры (3.125)	80	17.1 ± 0.76	2.3 (15.5)	0.007594649

Таблица 3 – Выживаемость нематод после инкубации с наноконтейнерами галлуазит+куркумин/декстрин (0.05, 0.5, 1 мг/мл) и бактериями *S. marcescens* в течение 25 суток.

Концентрация вещества мг/мл (мкг/лунка)	Общее количество нематод	Средняя продолжительность жизни±Стандартная ошибка	Изменение относительно контроля, дни (%)	Вероятность ошибки относительно контроля (логранговый критерий)
контроль (<i>S. marcescens</i>)	269	7.25 ± 0.27		
1 галлуазит (62.5)	132	6.72 ± 0.37	-0.53 (-7.31)	0.133102
0.5 галлуазит (31.25)	117	7.53 ± 0.43	0.28 (3.86)	0.277468
0.05 галлуазит (3.125)	139	7.41 ± 0.35	0.16 (2.21)	0.7859
1 наноконтейнеры (62.5)	138	14.3 ± 0.59	7.05 (97.24)	< 0.0001
0.5 наноконтейнеры (31.25)	126	14.18 ± 0.60	6.93 (95.59)	< 0.0001
0.05 наноконтейнеры (3.125)	140	13.75 ± 0.46	6.5 (89.66)	< 0.0001

Анализ эффективности загрузки позволил определить количество инкапсулированного куркумина в нанотрубках. В анализе жизнеспособности нематод концентрация куркумина, загруженного в 62.5 мкг/лунка наноконтейнеров, составила 15.3 мкМ (~ 5.63 мкг/лунка). Таким образом, эффект куркумина усиливается за счет его инкапсуляции в нанотрубки галлуазита, поскольку обработка нематод, питающихся *E. coli*, примерно таким же количеством чистого куркумина (17 мкМ, ~ 6.25 мкг/лунка) увеличила продолжительность жизни животных только на 12.75 %, что в 1.8 раз меньше по сравнению с нематодами, обработанными наноконтейнерами галлуазит+куркумин/декстрин. Таким образом куркумин, доставленный в организм нематод с помощью нанотрубок галлуазита, вследствие лучшего проникновения и пролонгированного действия, эффективнее увеличивает жизнеспособность нематод *C. elegans*. Влияние куркумина на продолжительность жизни нематод было более выраженным у животных, которых кормили *S. marcescens* и подвергали воздействию наноконтейнеров галлуазит+куркумин/декстрин. Как показано на рис.16Б и в таблице 3, галлуазит+куркумин/декстрин в линейной зависимости от концентрации (0.05, 0.5 и 1 мг/мл) значительно увеличил среднюю продолжительность жизни нематод (примерно в 2 раза, $P<0.0001$) на 89.7 %, 95.6 % и 97 %, соответственно, по сравнению с контрольными животными. Таким образом, куркумин, загруженный в наноконтейнеры, способен снизить вирулентность бактерий и усилить иммунитет организма хозяина. Обработка нематод нанотрубками галлуазита (в концентрациях 0.05, 0.1, 0.5, 1 мг/мл) при кормлении бактериями *E. coli* не влияет на продолжительность жизни нематод (рис.1В). Не наблюдалось и значительной разницы в продолжительности жизни между контрольными и обработанными нанотрубками галлуазита (0.05-1 мг/мл) нематодами и при инкубации с *S. marcescens* (рис.16Б). Таким образом,

стимулирующий эффект галлуазит+куркумин/декстрин на выживаемость нематод можно связать с антимикробной активностью куркумина, которая подавляет патогенность бактерий.

Полученные в настоящей работе результаты указывают на то, что загруженный в нанотрубки галлуазита куркумин проявляет выраженное селективное антибактериальное действие в отношении патогенных бактерий, в то время как рост симбиотической микрофлоры не подавляется. Полученные данные коррелируют с тем, что куркумин-загруженные наноконтейнеры оказали наиболее сильное отрицательное воздействие *in vitro* на бактерии *S. marcescens* по сравнению с бактериями *E. coli*, хотя оба вида относятся к грамотрицательной группе бактерий. Полученные в работе результаты согласуются с данными о подавлении ванилиновой кислотой патогенности бактерий *S. marcescens* в организме хозяина *C. elegans* [Sethupathy *et al.*, 2017]. Поскольку ванилиновая кислота является продуктом распада куркумина [Anubala *et al.*, 2016], то молекулярный механизм антимикробного действия куркумин-загруженных нанотрубок на *S. marcescens* может быть идентичным QS – блокирующему влиянию ванилиновой кислоты на *S. marcescens*. Следовательно, наноконтейнеры галлуазит+куркумин/декстрин с QS – ингибирующим свойством биологически активного соединения – куркумина, являются потенциальным терапевтическим кандидатом для более эффективного, по сравнению с чистым куркумином, лечения инфекций, вызванных бактериями *S. marcescens*, без токсического влияния на выживаемость кишечной микрофлоры *E. coli*. Пероральный прием наноконтейнеров способствует оздоровлению организма нематод и укреплению иммунитета при инфицировании патогенными бактериями *S. marcescens* и не оказывают сильного вредного воздействия на нормальную микрофлору *E. coli*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изменения нормального микробного сообщества в пищеварительном тракте, вызванные применением антибиотиков, могут оказывать серьезное влияние на здоровье и благополучие человека. Разработка новых высокоэффективных антимикробных препаратов, нацеленных на патогенную микрофлору и не токсичных для симбиотической микрофлоры, является одним из наиболее актуальных направлений в биотехнологии и медицинской микробиологии. Альтернативой антибиотикам являются полифенольные соединения природного происхождения, обладающие широким спектром противомикробной деятельности. Практическое применение полифенолов ограничивает их низкая биодоступность, связанная с их гидрофобными свойствами. Следовательно, одной из важнейших задач является создание новых средств доставки полифенольных соединений в клетки и ткани для увеличения биодоступности гидрофобных лекарств. В настоящей работе впервые получены антимикробные наноконтейнеры на основе нанотрубок галлуазита, загруженных куркумином и защищенные декстриновой оболочкой, и показано их эффективное использование для селективного подавления повышенного роста патогенных бактерий в нематодах *Caenorhabditis elegans*.

На основании полученных результатов были сделаны следующие выводы:

- 1) Установлено, что воздействие нанотрубками галлуазита в концентрациях 0.05-1 мг/мл не влияло на продолжительность жизни нематод *C. elegans*. Нанотрубки галлуазита не оказывали токсического воздействия на фертильность нематод и не вызывали стрессового ответа. Нанотрубки галлуазита локализуются исключительно в просвете кишечника нематод, без проникновения в другие органы и ткани.
- 2) Синтезированы стабильные в воде наноконтейнеры на основе нанотрубок галлуазита, заполненные куркумином с эффективностью загрузки препарата, составляющей 18.3 % по массе; покрытые ферментно-деградируемой декстриновой оболочкой, обеспечивающей контролируемое продолжительное высвобождение куркумина.
- 3) Установлено, что наноконтейнеры эффективно нарушают целостность стенок клеточной мембранны, ингибируют формирование биопленок и подавляют планктонный рост бактерий *S. marcescens*, в сравнении с *E. coli*. Куркумин-загруженные наноконтейнеры ингибируют QS-регулируемое продвижение и продукцию продигиозина у клеток *S. marcescens*.

- 4) Перорально вводимые наноконтейнеры с декстриновым покрытием проникают в кишечник нематод *C. elegans* и обеспечивают длительное высвобождение куркумина (до 6 суток) в организме нематод, окрашивая его ткани в желтый оттенок. Обработанные наноконтейнерами нематоды поглощают куркумин в количестве 4 и 6 нг в расчете на одного животного спустя 24 и 72 часа инкубирования, соответственно.
- 5) Обнаружено, что наноконтейнеры подавляют синтез и накопление пигмента продигиозина, продуцируемого клетками *S. marcescens*, в организме нематод. Обработка нематод, питавшихся *S. marcescens*, наноконтейнерами приводит к значительному снижению бактериальной колонизации и уменьшению растяжения просвета кишечника по сравнению с нематодами, выращенными с *E. coli*.
- 6) Наноконтейнеры, загруженные куркумином, независимо от вида бактериальной пищи, не влияют на поведенческие реакции нематод. Куркумин, высвобождаемый из наноконтейнеров, увеличивает репродуктивность, снижает накопление липофусцина и выработку активных форм кислорода в организме нематод, что увеличивает продолжительность жизни у нематод, обработанных непатогенными бактериями *E. coli* в 1.2 раза и у зараженных патогенными бактериями *S. marcescens* в 2 раза по сравнению с контрольными животными.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных изданиях

1. **Fakhrullina, G. I.** Selective Antimicrobial effects of curcumin@halloysite nanoformulation: a *Caenorhabditis elegans* study / **G. I. Fakhrullina**, E. I. Khakimova, F. S. Akhatova, Lazzara G., Parisi F., R. F. Fakhrullin // ACS Applied Materials and Interfaces. – 2019. – V. 11. – P. 23050-23064.
2. Stavitskaya, A.V. Antimicrobial applications of clay nanotube-based composites / A.V. Stavitskaya, S. N. Batasheva, V. A. Vinokurov, **G. I. Fakhrullina**, V. Sangarov, Y. M. Lvov, R. F. Fakhrullin // Nanomaterials. – 2019. – V. 9. – P. 708.
3. Шайхулова, С. Ф. *Caenorhabditis elegans* суалчанының био-наноагулышкыны өйрәнүдә алдынгы өлге булуы / С. Ф. Шайхулова, **Г. И. Фахруллина**, Л. Р. Нигаматзянова, Р. Ф. Фахруллин // Фәнни Татарстан. – 2019. – V. 1. – P. 128-136.
4. Panchal A. G., Self-assembly of clay nanotubes on hair surface for medical and cosmetic formulations / A. G. Panchal, **G. I. Fakhrullina**, R. F. Fakhrullin, Y. M. Lvov // Nanoscale. – 2018. – V. 10. – P. 18205-18216.
5. **Fakhrullina, G. I.** Toxicity of halloysite clay nanotubes in vivo: a *Caenorhabditis elegans* study / **G. I. Fakhrullina**, F. S. Akhatova, Y. M. Lvov, R.F. Fakhrullin // Environmental Science: Nano. – 2015. – V. 2. – P. 54-59.
6. Konnova, S. A. Silver nanoparticle-coated “cyborg” microorganisms: rapid assembly of polymer-stabilised nanoparticles on microbial cells / S. A. Konnova, A. A. Danilushkina, **G. I. Fakhrullina**, F. S. Akhatova, A. R. Badrutdinov, R. F. Fakhrullin // RSC Advances. – 2015. – V. 5. – P. 13530-13537.
7. Naumenko, E. A. Nano-labelled cells — a functional tool in biomedical applications / E. A. Naumenko, M. R. Dzamukova, **G. I. Fakhrullina**, F. S. Akhatova, R.F. Fakhrullin // Current Opinion in Pharmacology. – 2014. – V. 18. – P. 84-90.
8. **Däwlätşina, G. I.** Microworms swallow the nanobait: the use of nanocoated microbial cells for the direct delivery of nanoparticles into *Caenorhabditis elegans* / **G. I. Däwlätşina**, R. T. Minullina, R. F. Fakhrullin // Nanoscale. – 2013. – V. 5. – P. 11761-11769.

Глава в монографии

1. Batasheva, S. *Caenorhabditis elegans* Nematode: A Versatile Model to Evaluate the Toxicity of Nanomaterials In Vivo / Batasheva S., **Fakhrullina G.**, Akhatova F., Fakhrullin R. In: Kumar C. (eds) // Nanotechnology Characterization Tools for Environment, Health, and Safety. –2019. – P. 323-345, Springer, Berlin, Heidelberg.

Тезисы докладов конференций

1. **Фахруллина, Г.И.** Изучение влияния нанотрубок галлуазита на нематод *Caenorhabditis elegans* / **Г.И. Фахруллина**, Ф.С. Ахатова, , Р.Ф. Фахруллин // Сборник тезисов I Международной

школы-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Биомедицина, материалы и технологии XXI века» – Казань. – 2015. – С. 574.

2. **Фахруллина, Г.И.** Изучение влияния наноконтейнеров на основе галлуазитных нанотрубок на макроорганизм *Caenorhabditis elegans* / **Г.И. Фахруллина**, Э.И. Гаязова, Р.Ф. Фахруллин // «Биосистемы: организация, поведение и управление»: Тезисы докладов 69-й Всероссийской школы-конференции молодых ученых. – Н. Новгород. – 2016. – С. 159.

3. **Fakhrullina, G.I.** Investigation of distribution of nanoparticles and nanotubes inside *C. elegans* microworms using enhanced dark field microscopy / **G.I. Fakhrullina**, F.S. Akhatova, E.I. Gayazova, R.F. Fakhrullin. // V International scientific conference «STRANN-2016»: State-of-the-art Trends of Scientific Research of Artificial and Natural Nanoobjects – Saint Petersburg. – 2016. – Р. 120.

4. Гаязова, Э.И. Исследование распределения нанотрубок галлуазита в организме нематод *Caenorhabditis elegans* с использованием усиленного темнопольного микроскопа / Э.И. Гаязова, **Г.И. Фахруллина**, Ф.С. Ахатова, Р.Ф. Фахруллин // 12-ый Международный симпозиум Российского общества нематологов «Нематоды и другие линяющие организмы (Ecdysozoa) в процессах возрастающего антропогенного воздействия на экосистемы» – Н. Новгород. – 2017. – С. 31-32.

5. **Fakhrullina, G.I.** Polymer-modified biocompatible halloysite nanotubes doped composites for drug delivery and tissue engineering applications / **G.I. Fakhrullina**, E.I. Gayazova, E.A. Naumenko, A.A. Danilushkina, M.A. Krychkova, E.V. Rozhina, I.D. Guryanov, R.F. Fakhrullin, F.A. Akhatova, S.N. Batasheva, R.F. Fakhrullin // XVI International Clay Conference «ICC-2017» Scientific Research Abstracts – Granada (Spain). – 2017. – Р. 241.

6. Гаязова, Э.И. Изучение влияния ферментно-активируемых наноконтейнеров на основе галлуазита и куркумина на макроорганизм *Caenorhabditis elegans* / Э.И. Гаязова, **Г.И. Фахруллина**, Р.Ф. Фахруллин // Тезисы докладов 70-й Всероссийской с международным участием школы-конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление» – Н. Новгород. – 2017. – С. 41.

7. Gayazova, E.I. Investigation of halloysite nanotubes toxicity and the effect of enzyme-activated nanocontainers based on halloysite and curcumin using *Caenorhabditis elegans* nematodes / E.I. Gayazova, **G.I. Fakhrullina**, F.S. Akhatova, R.F. Fakhrullin. // International conference «Young biologists science week-2017» – Петрозаводск. – 2017. Р. 157-160.

8. **Фахруллина, Г.И.** Изучение влияния наноконтейнеров на основе галлуазита и куркумина на организм нематод *Caenorhabditis elegans* / **Г.И. Фахруллина**, Э.И. Гаязова, Л.Р. Нигаматзянова, Р.Ф. Фахруллин // «Биосистемы: организация, поведение, управление»: Тезисы докладов 71-й Всероссийской с международным участием школы-конференции молодых ученых» – Н. Новгород. – 2018. – С. 233.

9. Нигаматзянова, Л.Р. Эффекты наноконтейнеров на основе нанотрубок галлуазита на почвенные нематоды *Caenorhabditis elegans* / Л.Р. Нигаматзянова, **Г.И. Фахруллина**, Э.И. Хакимова, Р.Ф. Фахруллин // 2-я Конференция «Современные синтетические методологии для создания лекарственных препаратов и функциональных материалов» (MOSM2018) – Екатеринбург. – 2018. – С.154.

10. **Фахруллина, Г.И.** Исследование влияния наноконтейнеров на основе галлуазита и куркумина на организм нематод *Caenorhabditis elegans* в системе хозяин-микрофлора / **Г.И. Фахруллина**, Э.И. Хакимова, Р.Ф. Фахруллин // Четвертый междисциплинарный научный форум с международным участием «Новые материалы и перспективные технологии» - Москва, 2018. С.703-704.

11. **Фахруллина, Г.И.** Доставка куркумина в организм нематод *Caenorhabditis elegans* с помощью нанотрубок галлуазита / **Г.И. Фахруллина**, Ф.С. Ахатова, Л.Р. Нигаматзянова, Р.Ф. Фахруллин // Сборник тезисов III международной школы-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Материалы и технологии XXI века» - Казань, 2018. С.87.
12. **Fakhrullina, G.I.** Effects of curcumin-loaded halloysite on *C.elegans* nematodes in host-microbiome interactions / **G.I. Fakhrullina**, E.I. Hakimova, G. Lazzara, R.F. Fakhrullin. // Changing the face of modern medicine:stem cell and gene therapy abstracts – Lausanne (Switzerland), 2018. P.33.
13. Шайхулова, С.Ф. Эффекты композитного материала на основе нанотрубок галлуазита и куркумина на макроорганизм *Caenorhabditis elegans* в системе хозяин-микрофлора / С.Ф. Шайхулова, **Г.И. Фахруллина** // Материалы Международного молодежного научного форума «Ломоносов-2018» (электронный ресурс): Москва, МАКС Пресс.2018. – 1 электрон. опт. диск.
14. Akhatova, F.. Dark-field microscopy and hyperspectral imaging for detection and identification of nanoscale and microscale particles in cells, tissues and live organisms / F. Akhatova, **G. Fakhrullina**, L. Nigmatzyanova, A. Danilushkina, E. Naumenko, M. Kryuchkova, R. Fakhrullin. // 8th Black sea basin conference on analytical chemistry (8th BBCAC) Abstracts – Istanbul (Turkey), 2018. P.21-23.
15. Nigmatzyanova, L.R.. Using *Caenorhabditis elegans* for investigation the impact of the antimicrobial effect of nanocontainers based on halloysite and curcumin / L.R. Nigmatzyanova, **G.I. Fakhrullina**, E.I. Khakimova, F.S. Akhatova, R.F. Fakhrullin. // Nematodes and other Ecdysozoa under changing environments. Abstract of 13th International Nematological Symposium - Petrozavodsk, 2019. P.46-48.
16. **Фахруллина, Г.И.** Изучение антимикробного эффекта наноконтейнеров на основе куркумина и галлуазита / **Г.И. Фахруллина**, Э.И. Хакимова, Ф.С. Ахатова, Р.Ф. Фахруллин // Материалы VI Международной Конференции «Современные биотехнологии для науки и практики» - Санкт-Петербург, 2019. С.54-55.
17. Stavitskaya, A. Fluorescent and antibacterial nanomaterials on a base of natural mesoporous tubes and their behavior *in vivo* / A. Stavitskaya, **G. Fakhrullina**, M. Artemova, D. Logvinenko, A. Novikov, D. Kopitsyn, R. Fakhrullin. // 6th International Conference on Multifunctional, Hybrid and Nanomaterials (HYMA 2019) – Sitges (Spain), 2019. P3.058.
18. Akhatova, F.S. Selective DNA-damaging activity of curcumin@halloysite nanoformulation / F.S. Akhatova, **G.I. Fakhrullina**, E.A. Naumenko, L.R. Nigmatzyanova, R.F. Fakhrullin. // ESGCT 27th annual congress in collaboration with Setgyc: abstract book. – Barcelona (Spain), 2019. P.643.
19. **Фахруллина, Г.И.** Антимикробный эффект ферментно-активируемых наноконтейнеров на основе галлуазита и куркумина / **Г.И. Фахруллина**, Э.И. Хакимова, Л.Р. Нигаматзянова, Ф.С. Ахатова, Р.Ф. Фахруллин // Пятый междисциплинарный научный форум с международным участием "Новые материалы и перспективные технологии" - Москва, 2019. С.342-343.
20. **Fakhrullina, G.I.** Antimicrobial effects of curcumin-loaded halloysite on *Caenorhabditis elegans* nematodes / **G.I. Fakhrullina**. E.I. Hakimova, G. Lazzara, R.F. Fakhrullin. // Interaction: from cell to human abstract book of the Russian-German Seminar dedicated to the 30th anniversary of partnership between Justus Liebig University Giessen and Kazan (Volga-Region) Federal University – Kazan, 2019. P.10.

Адрес для отзывов на автореферат: 420008, Казань, ул. Кремлевская, д.18, Казанский федеральный университет, отдел аттестации научно-педагогических кадров, Ученому секретарю диссертационного совета КФУ.03.07 к.б.н., доц. Кравцовой Ольге Александровне, E-mail: okravz@yandex.ru