

*На правах рукописи*

**Шевченко  
Константин Георгиевич**

**РАЗРАБОТКА МЕТОДА ИССЛЕДОВАНИЯ КОМПЛЕКСОВ ГЕТЕРОГЕННЫХ  
НАНОЧАСТИЦ НА ОСНОВЕ ЭФФЕКТА ЛОКАЛИЗОВАННОГО  
ПОВЕРХНОСТНОГО ПЛАЗМОННОГО РЕЗОНАНСА И ЕГО ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ  
БИОМЕДИЦИНСКИХ ПРИЛОЖЕНИЙ**

03.01.02 – биофизика

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва  
2019

Работа прошла апробацию на кафедре физико-химической биологии и биотехнологии федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)»

**Научный руководитель:** Никитин Максим Петрович, кандидат физико-математических наук, руководитель лаборатории нанобиотехнологий Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)».

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное учреждение «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт».

Защита состоится «20» декабря 2019 года в 10.00 на заседании диссертационного совета ФБМФ03.01.02. 006, по адресу: 115184, г. Москва, Климентовский пер., д.1, стр. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Московского физико-технического института (национальный исследовательский университет) <https://mipt.ru/education/post-graduate/soiskateli-biologicheskie-nauki.php>.

Работа представлена «3» октября 2019 г. в Аттестационную комиссию федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)» для рассмотрения советом по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук в соответствии с п.3.1 ст. 4 Федерального закона «О науке и государственной научно - технической политике».

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность исследования

Самособирающиеся наноконплексы в настоящий момент рассматриваются как один из наиболее перспективных инструментов для решения задач в широком спектре областей от микроэлектроники до охраны окружающей среды [Grzelczak et al., 2010; Nie, Petukhova, Kumacheva, 2010]. Они позволяют создавать новые материалы для биомедицины, способные специфично распознавать изменения физических свойств или биологического состава своего окружения и реагировать на это запрограммированным изменением своей архитектуры [Nikitin et al., 2014], высокоточные биосенсоры тяжелых металлов, малых молекул и различных диагностических маркеров [Canfarotta et al., 2018; Mayer, Hafner, 2011], новые методы высокоточного нацеливания препаратов для эффективной и безопасной терапии рака [Kumar, Mohammad, 2011; Tyrrell, Shen, Radosz, 2010]. Одной из ключевых проблем при разработке таких систем является необходимость контроля их состояния в ходе сборки или диссоциации, по возможности в режиме реального времени и с минимальным воздействием на их структуру и свойства.

Существующие методы исследования поведения наночастиц и наносистем не являются оптимальными в силу существенных недостатков каждого из них. Электронная микроскопия позволяет получить высокоточные данные о структуре и морфологии объекта, однако плохо применима для исследования систем, собранных при помощи слабых нековалентных взаимодействий [Wang, 2000]. В ходе подготовки образца они часто подвергаются разрушению или агрегации. Модификации метода, такие как криоэлектронная микроскопия позволяют преодолеть данное ограничение, однако они малодоступны [Kutuzov et al., 2007; Luo et al., 2017]. Динамическое рассеяние света позволяет оценить изменение размера и распределение наноструктур *in situ*, однако обладает недостаточным разрешением для объективного распознавания собранной структуры от ее отдельных компонентов [Lim et al., 2013]. Наконец, методом отслеживания наночастиц, основанным на темнопольной оптической микроскопии можно существенно увеличить разрешение анализа, однако он применим лишь в узком коридоре концентраций наночастиц в растворе [Sokolova et al., 2011].

Поверхностный плазмонный резонанс является одним из наиболее мощных инструментов для оценки взаимодействия как отдельных молекул, так и наночастиц друг с другом [Dykman, Khlebtsov, 2012]. Его использование не требует сложной подготовки образца, либо комбинации нескольких методов для получения и обработки результатов. Сдвиг максимума спектра экстинкции локализованного поверхностного плазмонного резонанса при агрегации или диссоциации золотых наночастиц, сопровождающийся визуальным изменением цвета раствора, является одним из фундаментальных принципов при создании биосенсоров малых молекул и

колориметрических логических элементов на их основе [Khlebtsov, 2008]. Неинвазивность метода, а также возможность его использования для анализа в реальном времени делает его ещё более востребованным. Однако до настоящего времени исследование нековалентных систем самосборки при помощи анализа сдвига максимума спектра экстинкции плазмонного резонанса ограничивалось взаимодействием металлических наночастиц друг с другом [Homola, Piliarik, 2006], несмотря на перспективность расширения его применения для изучения взаимодействий металлических частиц с неметаллическими объектами. Примечательно, что данный подход потенциально может быть использован не только для контроля взаимодействия наночастиц друг с другом, но и для контроля взаимодействия с плазмонными частицами любых других объектов сопоставимого размера (бактериальные клетки, вирусные капсиды, крупные биополимеры).

Таким образом, актуальность разработки нового метода исследования поведения гетерогенных структур на основе наночастиц путем оценки сдвига максимума спектра экстинкции локализованного поверхностного плазмонного резонанса не ограничивается получением фундаментальных знаний о поведении супрамолекулярных систем в коллоидных растворах, но также является крайне актуальной для прикладных исследований в самых разных областях - нанотехнологий, молекулярной биологии, бисенсорики и медицинской диагностики.

### **Цели и задачи исследования**

#### **Цель:**

Цель работы заключалась в разработке метода оценки эффективности сборки и разборки самособирающихся комплексов на основе наночастиц за счет анализа сдвига локализованного поверхностного плазмонного резонанса и исследование потенциальных областей его применения.

#### **Задачи:**

1. Разработка метода исследования структуры самособирающихся гетерогенных систем на основе специфичного взаимодействия плазмонных частиц с неплазмонными объектами, за счет анализа сдвига максимума спектра экстинкции локализованного поверхностного плазмонного резонанса в режиме реального времени.
2. Сравнительный анализ чувствительности разработанного метода с существующими биохимическими методами анализа структуры гетерогенных самособирающихся наносистем.
3. Исследование возможности потенциального применения полученного метода для оценки кинетики сборки и разборки самособирающихся структур на основе наночастиц.

4. Анализ возможности использования полученного метода в создании биосенсоров для селективного и обратимого мечения молекулярных мишеней.
5. Оценка применимости полученного метода для анализа специфичности и эффективности связывания с мембраной клеток молекул, конъюгированных на поверхности наночастиц.
6. Исследование возможности использования полученного метода для анализа кинетики связывания и диссоциации белков, конъюгированных с наночастицами, со своими мишеням на поверхности клеток.

#### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Разработан, описан и оптимизирован новый неинвазивный метод исследования структуры и поведения гетерогенных самособирающихся лиганд-зависимых комплексов наночастиц на основе анализа спектра экстинкции локализованного поверхностного плазмонного резонанса, позволяющий оценивать кинетику их сборки и разборки.
2. Создана новая безметочная система типа сенсор-актюатор, использующая эффект локализованного поверхностного плазмонного резонанса для селективного и обратимого мечения надмолекулярных мишеней и пригодная для применения в условиях *in situ*.
3. На примере деполимераз профагов и бактериофагов *Acinetobacter baumannii* была показана возможность использования разработанного метода для оценки специфичности и эффективности связывания с мембраной клеток молекул, конъюгированных с поверхностью наночастиц.
4. На модели деполимераз профагов и бактериофагов была продемонстрирована возможность использования сдвига локализованного поверхностного плазмонного резонанса для оценки кинетики связывания и диссоциации литических ферментов на поверхности наночастиц со своими мишеням на поверхности клеток.

#### **Научная новизна работы**

В настоящей работе впервые была показана возможность исследования с помощью анализа сдвига максимума спектра экстинкции локализованного поверхностного плазмонного резонанса взаимодействия плазмонных наночастиц с неплазмонными в режиме реального времени при сборке и разборке лиганд-зависимых комплексов на их основе. Далее, была подтверждена обратимость данного изменения в системах, основанных на нековалентных слабых взаимодействиях наночастиц, что позволило разработать новый тип безметочного биосенсора, пригодного для селективного и обратимого мечения молекулярных мишеней *in situ*.

Также был разработан оригинальный метод анализа специфичности связывания деполимеразми бактериофагов капсульных полисахаридов бактерий и показана его

эффективность на примере деполимеразы профага штамма *A. baumannii* 8300 (Dpo8300). В ходе решения данной задачи, впервые была описана кинетика связывания и диссоциации с клеточной стенкой бактерий деполимеразы профага штамма *A. baumannii* 8300 (Dpo8300), иммобилизованной на поверхности частиц, что представляет собой значимый результат для этой активно развивающейся области.

### **Теоретическое и практическое значение работы**

В результате выполнения настоящего исследования был создан уникальный спектрофотометрический метод для исследования в режиме реального времени взаимодействия наночастиц друг с другом в составе лиганд-зависимых комплексов, анализа кинетики различных молекулярных процессов в условиях *in situ* и скрининга антибактериальных препаратов, связывающих и разрушающих мембрану. Он может быть успешно использован для прикладных разработок в молекулярной биологии и медицинской микробиологии, а также для создания различных наборов для *in vitro* диагностики.

### **Апробация работы**

Материалы диссертации были представлены на следующих международных конференциях: 17th International Conference Laser Optics (Санкт-Петербург, 2016), 3rd International Conference Nanotech France (Париж, 2017), 12th International Conference on the Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers (Копенгаген, 2018), 18th International Conference Laser Optics (Санкт-Петербург, 2018), 26th Conference of the European Cell Death Organization (Санкт-Петербург, 2018), Future of Biomedicine Conference (Владивосток, 2019). Статья по теме диссертации заняла 2-е место в конкурсе лучших (из 1700 представленных) работ на престижной Международной конференции Biosensors 2016 (26th Anniversary World Congress on Biosensors, 25-27 May 2016, Gothenburg, Sweden).

### **Объем и структура диссертации**

Диссертация содержит следующие разделы: введение; 4 главы - обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение; основные выводы и список цитируемой литературы, содержащий 209 наименований. Материалы диссертации изложены на 96 страницах машинописного текста и иллюстрированы 23 рисунками. Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ 16-32-00791 мол\_а и 18-03-01252 А.

### **Личный вклад автора**

Автор активно участвовал в определении направлений исследования и постановке конкретных задач, а также выборе методов и подходов для их решения, анализе результатов и формулировании выводов. Все основные эксперименты были выполнены автором лично,

отдельные эксперименты – с его участием. Автор принимал непосредственное участие в планировании и подготовке экспериментов по электронной микроскопии, в том числе выполненных в ЦКП МФТИ. Деполимераза профага штамма *A. baumannii* 8300 (Dpo8300) была получена совместно с Анастасией Владимировной Поповой. Полученные результаты обсуждались и публиковались совместно с научным руководителем и соавторами.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Получение наночастиц.** В работе были использованы следующие типы наночастиц магнитные микросферы Estapor MN1-020/50 230 нм, покрытые карбоксилированным полистиролом (Merck Millipore, Франция), золотые (AuNP) и ферригидритные наночастицы (FH). Золотые наночастицы получали цитратным восстановлением  $\text{HAuCl}_4$  (Драгцветмет, Россия) в соответствии с модифицированным протоколом Turkevich et al., 1951 [Turkevich, Stevenson, Hillier, 1951]. Ферригидритные наночастицы получались путем осаждения хлорида железа (III) (Sigma-Aldrich, Германия) в щелочной среде с последующим покрытием их поверхности карбоксиметил-декстраном (Sigma Aldrich, Германия) по протоколу Nikitin et al., 2014 [Nikitin et al., 2014].

**Конъюгация наночастиц с белками.** Магнитные и ферригидритные наночастицы функционализировались белками методом восстановленных эфиров. Карбоксильные группы на поверхности частиц активировались смесью EDC и sulfo-NHS (Sigma-Aldrich, Германия) в MES буфере, после чего к ним добавлялись необходимые белки в выбранных концентрациях в боратном буфере. Полученная смесь инкубировалась ночь, после чего трижды отмывалась на магнитном штативе 1% раствором бычьего сывороточного альбумина (БСА) в PBS (ПанЭко, Россия). Магнитные частицы конъюгировались с хлорамфениколированным и биотинилированным БСА (ХАФ-БСА и БИО-БСА), ферригидритные частицы конъюгировались со стрептавидином и HRP (ThermoFisher, США). Функционализация золотых наночастиц антителами к ХАФ (клон B10, ВНИИМДЛ, Россия), стрептавидином, WGA (Sigma-Aldrich, Германия) и деполимеразами профагов осуществлялась методом электростатической сорбции. Специфичность полученных конъюгатов наночастиц с биомолекулами оценивалась методом тонкослойной хроматографии на тест-полосках.

**Получение лиганд-зависимых наноструктур.** Модельные лиганд-зависимые наноструктуры получались путем совместной инкубации конъюгатов магнитных наночастиц с различными количествами AuNP-анти-ХАФ в течение 1 часа в 1% БСА в PBS. Для разборки структур к ним добавляли раствора ХАФ в ДМСО (Sigma-Aldrich, Германия) и инкубировали в течение 2 часов. Для запрета сборки раствор ХАФ в ДМСО добавляли к конъюгатам AuNP-анти-ХАФ до их совместной инкубации с магнитными наночастицами. После инкубации магнитные частицы трижды промывали на магнитном штативе в 1% БСА в PBS. Для проведения анализа связывания наночастицами мишени к коллоидному раствору наноструктур добавляли конъюгаты ферригидритных наночастиц и инкубировали в течение 15 минут. Непрореагировавшие конъюгаты удалялись из раствора путем осаждения на магнитном штативе пять раз в 1% БСА в PBS. Затем к ним добавлялся раствор ТМБ (Sigma-Aldrich, Германия). После проявления окраски магнитные частицы разделяли на магнитном штативе, реакция HRP с ТМБ останавливалась добавлением концентрированной серной кислоты.

**Получение деполимераз бактериофагов.** Деполимераза профага штамма *A. baumannii* 8300 (Dpo8300), расщепляющая капсульные полисахариды *A. baumannii*, была идентифицирована путем биоинформационного анализа полногеномных последовательностей бактериофагов. Далее

они были клонированы в плазмидные векторы экспрессии стандартными методами генной инженерии. Рекомбинантные белки были экспрессированы в виде химерных конструкций с белком SlyD в клетках *Escherichia coli*. Далее клетки разрушались ультразвуком, а рекомбинантные ферменты выделялись и очищались с помощью металл-хелатной аффинной хроматографии с последующей ионообменной хроматографией и гель-фильтрацией.

**Получение комплексов наночастиц с бактериальными клетками.** Полученные ранее наночастицы, функционализированные лигандами, распознающими мишени на поверхности бактериальных клеток (STR, WGA, деполимеразы бактериофагов), инкубировались с бактериальными клетками в соотношении 100 мкл культуры бактериальных клеток с оптической плотностью OD=0.2 к 8,3 pM AuNP.

**UV-Vis спектрофотометрия.** Анализ спектров экстинкции коллоидных растворов наноструктур и наночастиц, иммобилизованных на клетках проводился в 384-луночных прозрачных планшетах на спектрофотометре-люминометре-флуориметре Clariostar (BMG Labtech, Германия).

**Сканирующая электронная микроскопия.** Собранные структуры отмывались от примесей на магнитном штативе. После этого они переносились на кремниевую пластину, предварительно обработанную смесью концентрированной серной кислоты и перекиси водорода. Изображения получались при напряжении 30 кВ на микроскопе MAIA3 (Tescan, Чехия) и на микроскопе JEOL JSM-7001F (Jeol, США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе показана возможность использования локализованного поверхностного плазмонного резонанса (ЛППР) для исследования нековалентного специфичного взаимодействия друг с другом гетерогенных нано- и микроразмерных частиц и объектов, в том числе неплазмонных, в составе лиганд-зависимых комплексов. Кроме того, была продемонстрирована возможность прикладного использования разработанного метода для оценки кинетики сборки и диссоциации подобных наноконструкций, создания «умных» наносенсоров для использования *in situ*, скрининга антибактериальных агентов на примере деполимеразы профага штамма *A. baumannii* 8300 (Dpo8300), и исследования кинетики связывания и диссоциации данного фермента с капсульными полисахаридами бактерий.

### 1. Разработка и оптимизация метода оценки взаимодействия гетерогенных наночастиц друг с другом на основе анализа сдвига локализованного поверхностного плазмонного резонанса.

Одним из наиболее интересных применений самособирающихся наноструктур, из показанных в последние годы, стала имплементация полного набора унарных и бинарных Булевых функций с их помощью. Базовой структурой для этого стала биокomпьютеринговая модель функции «ДА», при которой специфичный входной сигнал, такой как появление в среде определенной малой молекулы, запускает диссоциацию комплекса, ведущую к запрограммированному логическому ответу [Nikitin et al., 2014]. Простота и наглядность данной модели послужили причиной её выбора для демонстрации возможности использования сдвига спектра ЛППР для неинвазивной оценки взаимодействия наночастиц друг с другом. Поскольку



экранирование рецептора исходящего сигнала в данной системе критически зависит от плотности сборки золотых наночастиц (AuNP) на поверхности базовых частиц, было сделано предположение, что полученного сближения частиц друг с другом будет также достаточно и для сдвига спектра ЛППР (Рисунок 1).

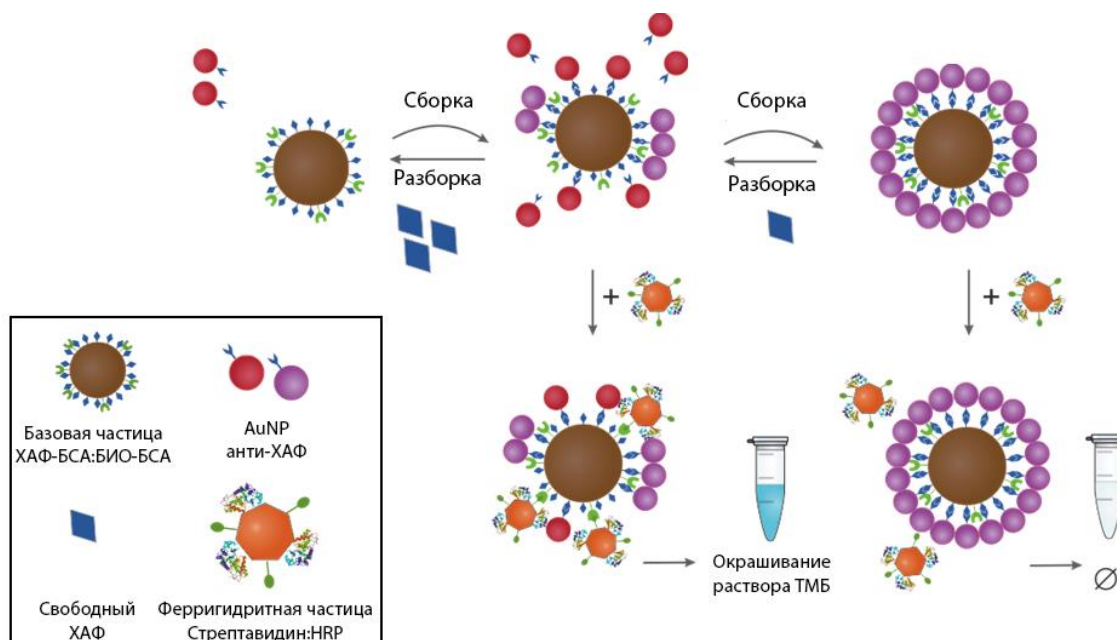


Рисунок 1. Схема работы лиганд-зависимого комплекса для реализации биоконьютинговой функции «ДА». На базовой магнитной наночастице со средним гидродинамическим диаметром 230 нм иммобилизованы рецептор входящего сигнала (ХАФ-БСА) и рецептор исходящего сигнала (БИО-БСА). В собранном состоянии в результате сближения друг с другом экранирующих AuNP, функционализированных антителами к ХАФ (анти-ХАФ), происходит сдвиг максимума спектра экстинкции ЛППР в красную область. Кроме того, они стерически блокируют взаимодействие рецептора исходящего сигнала со своим лигандом - стрептавидином. Таким образом, не происходит связывания с ферригидритной частицей-мишенью, функционализированной стрептавидином и пероксидазой хрена (HRP). При добавлении ТМБ, служащего субстратом для HRP, раствор не окрашивается. В присутствии свободного ХАФ происходит разборка системы в результате конкурентного связывания гаптена с рецептором входящего сигнала. Происходит обратный сдвиг максимума спектра экстинкции ЛППР, а частица-мишень получает возможность взаимодействия с рецептором исходящего сигнала. Таким образом, при добавлении ТМБ, происходит окрашивание раствора.

Действительно, спектр экстинкции собранных структур сильно отличался по своей форме от такового для свободных AuNP. Кроме того, максимум спектра экстинкции собранной структуры был значительно смещен (порядка 50 нм) в красную область по сравнению с максимумом поглощения AuNP ( $\lambda=538$  нм). Столь значительный сдвиг был получен при использовании базовых частиц, конъюгированных с ХАФ-БСА в концентрации 32 мкг/мл, и при добавлении к ним 6,8 нМ AuNP-анти-ХАФ. Далее предварительно собранная конструкция была подвергнута обратному процессу специфической разборки при наличии молекулярного входа - свободного ХАФ. Максимум поглощения сместился в область более коротких длин волн, и его значение было почти таким же как для свободного коллоидного золота, что свидетельствовало о разборке структуры. Специфичность сборки проверялась путем её запрета за счет

предварительной инкубации AuNP-анти-ХАФ со свободным ХАФ. В этом случае максимум поглощения системы оставался таким же, как у свободного коллоидного золота. Его положение (538 нм) оставалось неизменным для всех последующих экспериментов по запрету сборки, а также при оценке специфичности сигнала (например, при инкубации частиц без специфических компонентов - анти-ХАФ или ХАФ-БСА). При этом данные о собранном или разобранном состоянии системы, полученные с помощью спектрального анализа, подтверждались сканирующей электронной микроскопией (Рисунок 2).

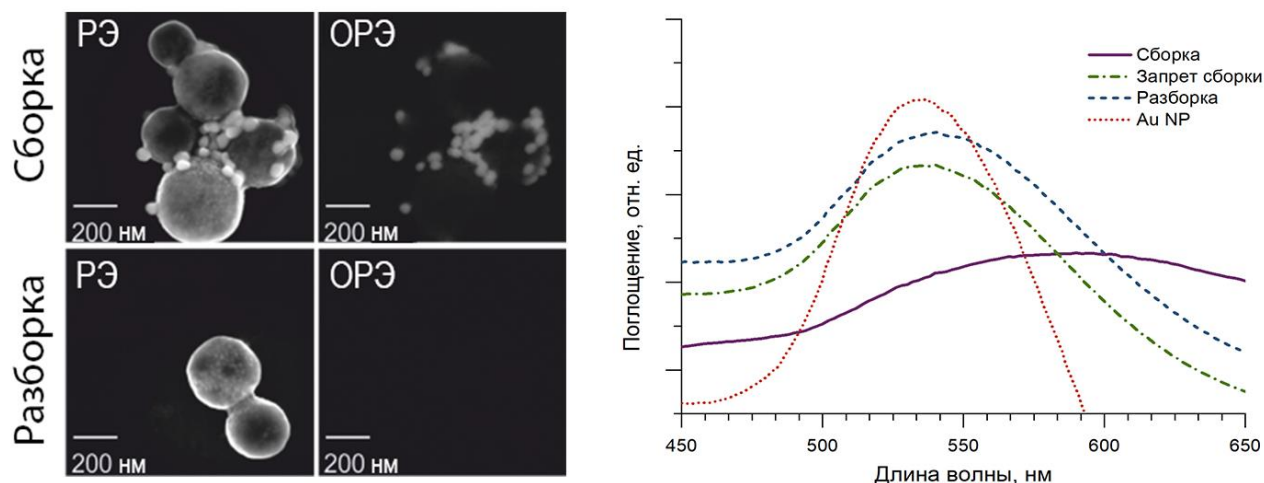


Рисунок 2. Слева – электронные микрофотографии, иллюстрирующие частичную сборку AuNP на магнитных микросферах, и специфичную разборку наноконлекса в присутствии свободного ХАФ. Данные получены с использованием датчиков рассеянных (РЭ) и обратно-рассеянных электронов (ОРЭ). Справа - зависимость формы и положения локального максимума спектра экстинкции ЛППР в ходе сборки и разборки лиганд-зависимого комплекса на основе наночастиц при фиксированной концентрации компонентов ( $[AuNP\text{-анти-ХАФ}] = 3,4 \text{ нМ}$ ;  $[ХАФ\text{-БСА}] = 32 \text{ мкг / мл}$ ).

После экспериментальной имплементации метода, были проведены его оптимизация и детальное исследование зависимости величины наблюдаемого сдвига спектра ЛППР от исходных концентраций отдельных компонентов и плотности иммобилизации золотых наночастиц на твердой фазе. Кроме того, было проведено сравнительное исследование его чувствительности и специфичности с методом на основе анализа активности пероксидазы хрена, иммобилизованной на поверхности ферригидритных наночастиц, способных связываться с поверхностью базовой частицы при условии её стерической доступности (пероксидазный анализ). Данный подход на сегодняшний день является стандартным при изучении сборки и разборки лиганд-зависимых наносистем.

Известно, что величина сдвига спектра локализованного поверхностного резонанса обратно пропорциональна расстоянию между частицами [Rechberger et al., 2003]. Следовательно, повышение плотности иммобилизации AuNP на поверхности базовых наночастиц будет приводить к более мощному сдвигу резонанса в красную область. При этом его величина должна

ассоциироваться с более эффективным экранированием рецептора исходящего сигнала и падением сигнала пероксидазного анализа. Действительно, повышение концентрации иммобилизованных на поверхности базовой частицы AuNP-анти-ХАФ приводило к прямо пропорциональному увеличению сдвига спектра ЛППР.

В случае минимального покрытия поверхности ХАФ-БСА лишь небольшая часть AuNP-анти-ХАФ связывалась с базовыми частицами. Сигнал пероксидазного анализа был максимальным, в то время как максимум спектра экстинкции ЛППР практически не сдвигался. Максимальная концентрация ХАФ-БСА на поверхности поверхности, напротив, давала инвертированные сигналы. Сдвиг спектра плазмонного резонанса и сигнал пероксидазного анализа в присутствии свободного ХАФ коррелировали друг с другом при всех количествах конъюгированного с базовыми частицами ХАФ-БСА: сдвиг спектра ЛППР оставался минимальным, в то время как сигнал пероксидазного анализа был максимальным, свидетельствуя о разборке системы (Рисунок 3).

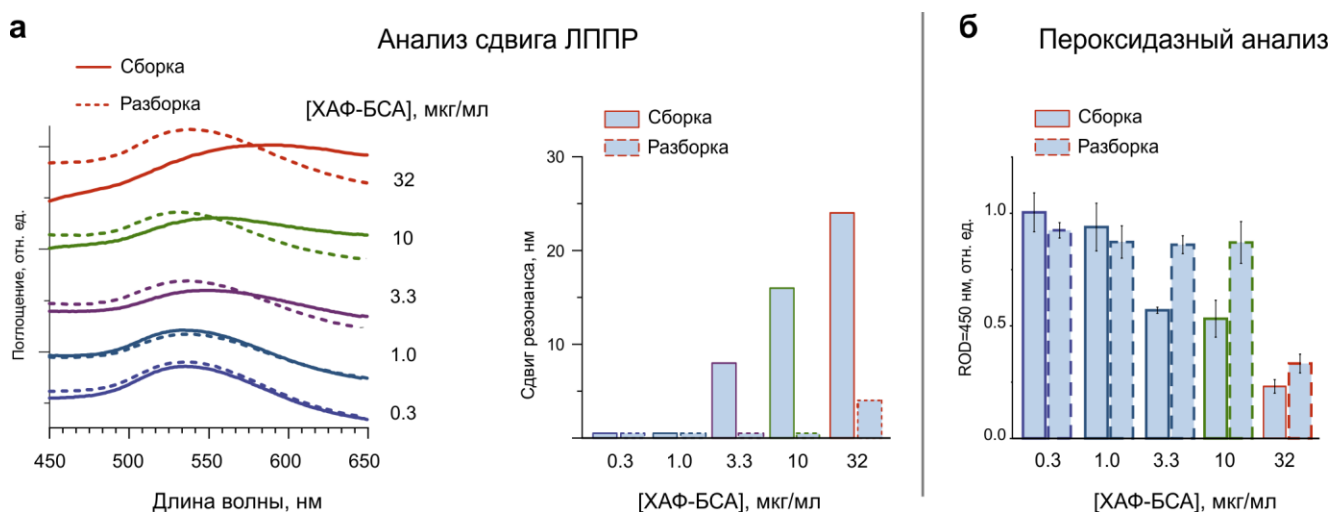


Рисунок 3. Сравнительный анализ сдвига спектра ЛППР (а) и сигнала пероксидазного анализа (б) при сборке и разборке лиганд-зависимых наносистем. Концентрация AuNP-анти-ХАФ в растворе фиксирована на значении 6.8 нМ, концентрация ХАФ-БСА при конъюгации с базовыми частицами варьирует от 0.3 мкг/мл до 32 мкг/мл.

Далее был проведен анализ корреляции данных методов при переменной концентрации экранирующих золотых наночастиц. Согласно полученным данным, двукратное увеличение или уменьшение концентрации AuNP-анти-ХАФ практически не влияло на сдвиг спектра ЛППР. Это свидетельствовало о том, что процесс сборки не зависит от диффузии, и концентрация AuNP-анти-ХАФ значительно выше, чем концентрация центров связывания на поверхности базовых частиц. Как и ожидалось, при разборке системы результаты пероксидазного анализа и сдвиг спектра ЛППР также хорошо коррелировали (Рисунок 4).

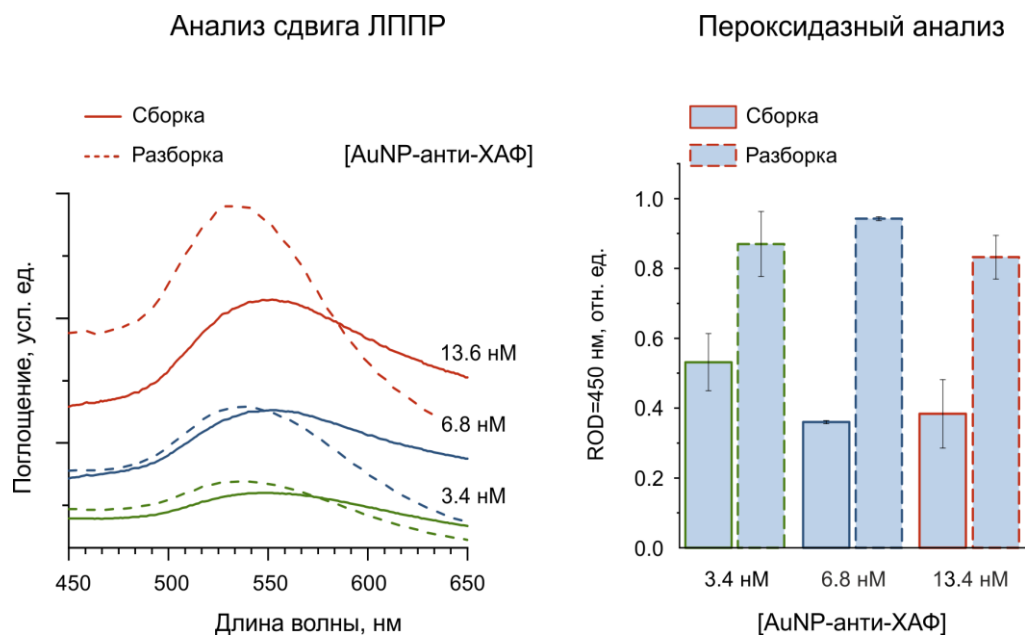


Рисунок 4. Сравнительный анализ величины сдвига спектра ЛППР (слева) и сигнала пероксидазного анализа (справа) при сборке и разборке лиганд-зависимых наносистем в зависимости от концентрации специфичных золотых наночастиц в растворе. Концентрация ХАФ-БСА при конъюгации с базовыми частицами фиксирована на значении 10 мкг/мл, чтобы сдвиг резонанса при сборке и разборке системы был максимальным. Концентрация AuNP-анти-ХАФ в растворе варьирует от 3.4 нМ до 13.6 нМ.

Для проверки чувствительности системы к входящему сигналу был проведен сравнительный анализ сдвига спектра ЛППР в двух различных форматах. В одностадийном формате свободный ХАФ в различных концентрациях добавлялся в предварительно собранную систему, в двухстадийном свободный ХАФ предварительно инкубировался с золотыми частицами перед сборкой системы. Как и ожидалось, в обоих случаях сдвиг спектра ЛППР был обратно пропорционален концентрации малой молекулы, однако, диапазоны чувствительности различались. Они находились в пределах более высокой (от  $7,8 \cdot 10^{-5}$  г/л до  $8,0 \cdot 10^{-2}$  г/л) и более низкой (от  $2,0 \cdot 10^{-5}$  г/л до  $1,2 \cdot 10^{-3}$  г/л) концентрации свободного ХАФ для двухстадийного и одностадийного форматов соответственно. Более того, предел обнаружения (LOD) был объективно ниже для двухэтапного формата. Дальнейшее изменение концентрации ХАФ до более высоких ( $>0,1$  г/л) или более низких ( $<10^{-5}$  г/л) значений не изменяло оптические свойства системы (Рисунок 5). Динамический диапазон чувствительности полученной системы, а также неинвазивность и простота метода анализа состояния, позволяют говорить о возможности ее использования в качестве биосенсора малых молекул в различных условиях.

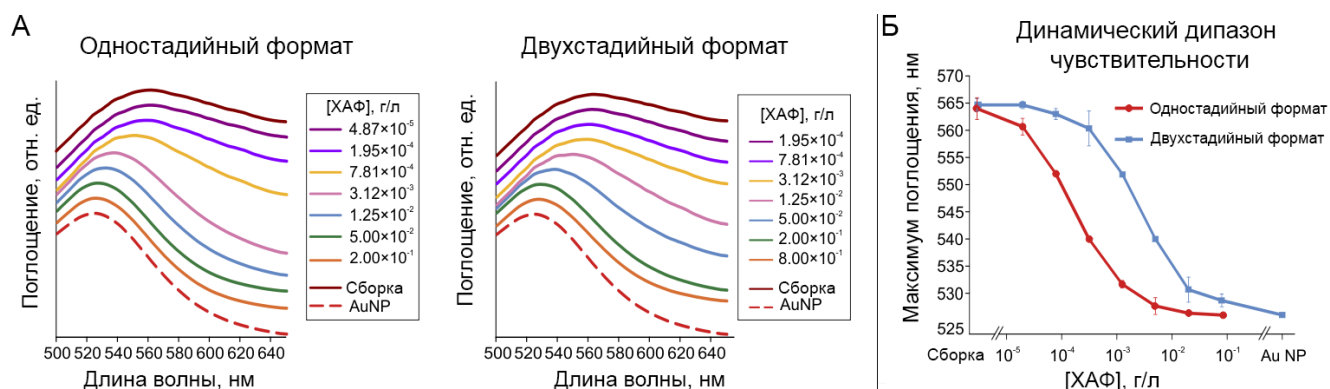


Рисунок 5. А. Сравнительный анализ чувствительности системы к входящему сигналу (свободный ХАФ) в одностадийном (слева) и двухстадийном форматах (справа). Б. Динамический диапазон чувствительности системы при использовании в различных форматах анализа.

## 2. Сдвиг спектра ЛППР как метод оценки кинетики сборки и разборки самособирающихся наноструктур.

Для демонстрации потенциального применения разработанного метода в нанотехнологиях было проведено исследование кинетики сборки и разборки наноструктур. Решение подобной задачи с использованием других методов и инструментов является достаточно сложным в силу их недостаточной чувствительности либо условий подготовки образца. На Рисунке 6 показаны измерения динамики сборки и разборки описанной выше биоконьютинговой модели в режиме реального времени. Стоит отметить, что сборка идет значительно медленнее, чем разборка. Полученные данные являются новыми и позволяют в дальнейшем оптимизировать протоколы получения и работы с аналогичными системами.

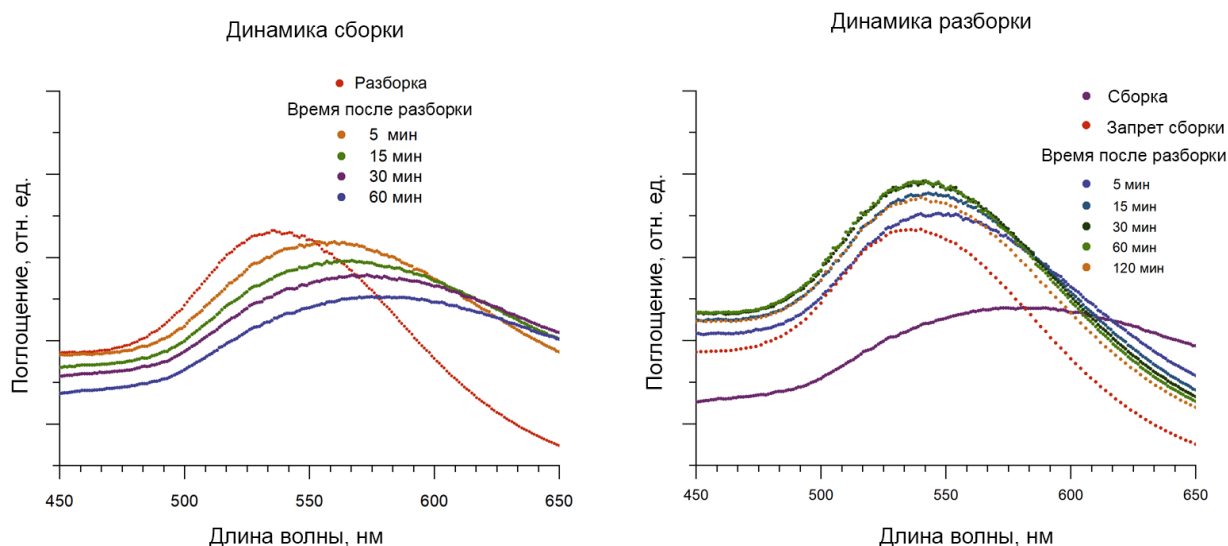


Рисунок 6. Динамика сдвига спектра ЛППР при сборке (слева) и разборке (справа) лиганд-зависимых гетерогенных комплексов наночастиц, имплементирующих логическую функцию «ДА». Концентрация ХАФ-БСА при конъюгации с базовыми частицами фиксирована на значении 10 мкг/мл. Концентрация AuNP-анти-ХАФ в растворе – 3.4 нМ.

Интересно, что обе динамики лучше всего аппроксимируются биэкспоненциальными функциями с соответствующими значениями периода по 2,1 мин и 53 мин для сборки и 1,0 мин и 24 мин для разборки. В течение первых 10 минут плотность сборки достигает порядка 50% от насыщения, оставшаяся поверхность базовой частицы заполнялась более двух часов. При этом, при разборке системы за первые 5 минут освобождается до 75% поверхности (Рисунок 7). Хотя сборка идет медленнее, время отклика полученной модели логического элемента быстрое, что делает эти структуры очень привлекательными кандидатами для создания биосенсоров и тераностических агентов, как будет показано ниже [Shevchenko et al., 2017].

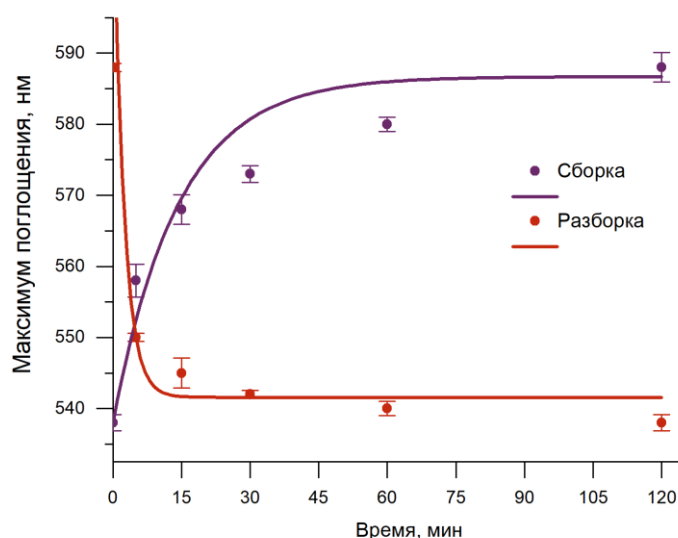


Рисунок 7. Динамика сборки и разборки лиганд-зависимой биоконъюгированной наносистемы, имплементирующей логическую функцию «ДА», в PBS. Концентрация ХАФ-БСА при конъюгации с базовыми частицами - 10 мкг/мл. Концентрация AuNP-анти-ХАФ в растворе – 3.4 нМ.

### 3. Создание биосенсора для анализа *in situ* на основе разработанного метода

Разработанный метод может использоваться для исследований не только в науках о материалах и нанотехнологиях, но и в других областях в силу возможности его имплементации при создании различных типов биосенсоров. В рамках настоящей работы сдвиг спектра ЛППР был использован при создании биосенсора для селективного и обратимого мечения молекулярных мишеней, пригодного для использования *in situ* в клеточной биологии [Shevchenko et al., 2018].

Ключевым фактором, определяющим оптические свойства разработанной системы, является плазменная природа AuNP. Величина сдвига спектра плазмонного резонанса обратно пропорциональна плотности иммобилизации золотых наночастиц на поверхности базовой и прямо пропорциональна концентрации ХАФ, таким образом, изменения спектральных свойств потенциального биосенсора носят постепенный характер и зависят от его молекулярного окружения. Однако, для применения разработанного метода при биосенсинге *in vitro* и *in vivo*,



его функциональность должна быть достаточной по меньшей мере для анализа в средах для культивирования клеток. Для проверки в указанных условиях была проведена сборка и разборка системы в 10% растворе фетальной бычьей сыворотки в PBS, служившим моделью среды для культивирования клеток. Примечательно, что поведение системы в более сложной и оптически менее прозрачной среде с насыщенным молекулярным окружением полностью коррелировало с тем, что наблюдалось ранее. Сдвиг спектра ЛППР был специфичным и обратимым, и единственной разницей по сравнению с поведением в 1% растворе БСА в PBS была его меньшая амплитуда ( $15 \pm 1$  нм).

Разработанная система также может функционировать и как актюатор за счет активности рецептора исходящего сигнала, например, связывая рецепторы на поверхности клеток и запуская внутриклеточные регуляторные каскады. Она может обрабатывать входящий сигнал, в данном случае изменение концентрации ХАФ в среде, и специфично воздействовать на клетку-мишень, например, связывая клеточные рецепторы и запуская те или иные внутриклеточные сигнальные пути. Моделью для данной функции служило связывание базовой частицы с твердой фазой, представленной ферригидритной частицей с иммобилизованной на ее поверхности HRP. Критерием для оценки эффективности работы актюатора в таком случае являлась интенсивность окрашивания раствора при добавлении в него субстрата, и ее зависимость от концентрации аналита в среде (в данном случае - свободного ХАФ). В такой конфигурации актюаторная функция имеет тип ВКЛ/ВЫКЛ, принимая предельные значения при наличии или отсутствии взаимодействий между частицами. Сигнал системы повышается при добавлении ХАФ (приблизительно до 0,05 г/л), и нечувствителен к ее дальнейшему увеличению (Рисунок 8).

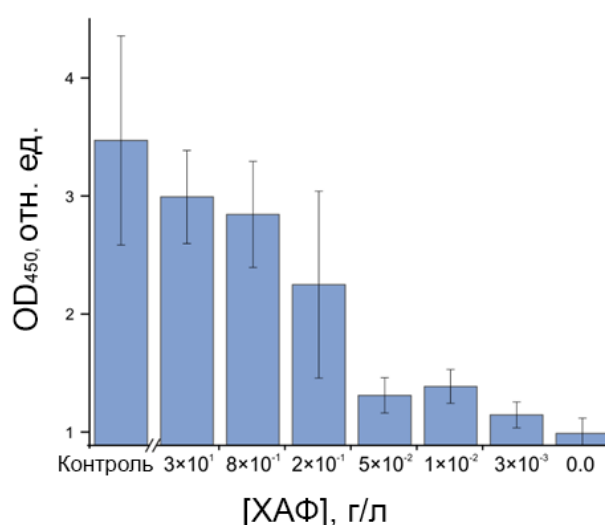


Рисунок 8. Оценка зависимости актюаторной функции лиганд-зависимой биокomпьютинговой системы от концентрации аналита (свободного ХАФ) в среде. При добавлении малой молекулы происходит разборка системы, и рецептор внешнего сигнала получает возможность связываться

со своей мишенью на поверхности ферригидритных наночастиц, функционализированных HRP. Окрашивание раствора при добавлении к нему ферментативного субстрата (ТМБ) служит индикатором числа связавшихся частиц, и отражает эффективность актюаторной функции системы в данной модели.

Разработанная система построена на основе нековалентного взаимодействия между молекулами на поверхности базовых и экранирующих частиц. В сочетании с низкой авидностью используемого клона антител, который образует данную связь, подобная особенность системы позволяет обеспечить обратимость изменений структуры и оптических свойств при снижении концентрации малой молекулы в среде. Чтобы проверить эту гипотезу, свободный ХАФ был удален из разобранный системы методом экспресс-гель-хроматографии на обессоливающих колонках. В результате происходила специфичная самосборка системы, сопровождавшаяся обратным 10-нм сдвигом резонанса и значительным падением сигнала пероксидазного анализа. Более того, сигнал уменьшался практически до уровня сигнала от полностью собранной системы, что, по-видимому, было связано с быстрым снижением эффективности связывания ферригидритных частиц с базовыми из-за стерической блокировки рецептора исходящего сигнала. Примечательно, что после второго добавления свободного ХАФ система разбиралась повторно и так же меняла свои оптические и биохимические свойства. Однако, из-за жесткого метода удаления, по-видимому, приводившему к механическому повреждению белковой короны, второй сдвиг резонанса был меньше, чем во время первоначальной сборки (Рисунок 9).

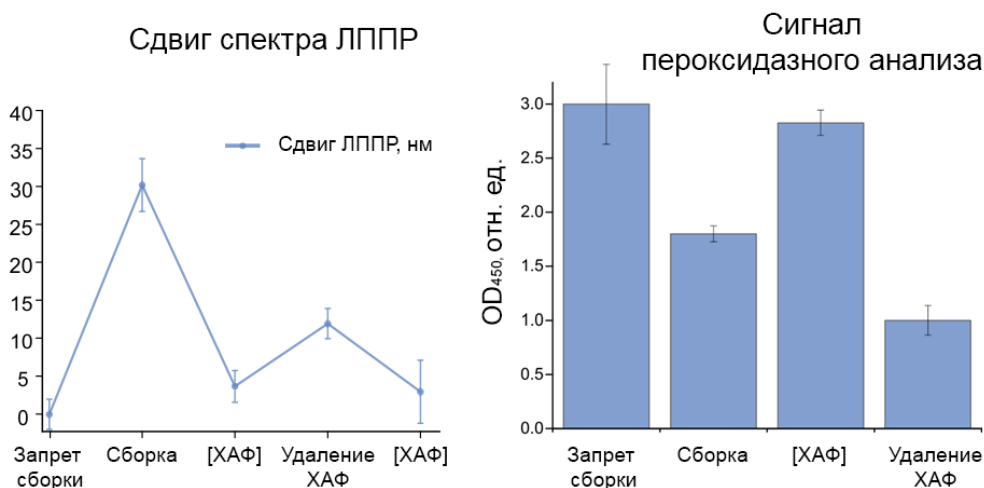


Рисунок 9. Обратимость сдвига спектра ЛППР (слева) и сигнала пероксидазного анализа (справа) при удалении ХАФ из среды.

#### 4. Использование сдвига спектра ЛППР для анализа связывания деполимераз профагов и бактериофагов, конъюгированных на поверхности созданных наночастиц, с капсульными полисахаридами клеточной стенки бактерий

Используемая в качестве модельной лиганд-зависимая система, описанная выше, позволяет использовать в качестве субстрата для сборки золотых наночастиц, регистрируемой за счет путем сдвига спектра ЛППР, не только наночастицы, но и более крупные объекты. Данное свойство позволяет существенно расширить потенциальный спектр применения как



разработанного метода исследования взаимодействия плазмонных наночастиц либо иммобилизованных на них молекул с неплазмонными объектами, так и создавать новые гибридные материалы. Одним из наиболее перспективных объектов в этом отношении являются бактериальные клетки. Состав, структура и свойства бактериальной мембраны большинства модельных объектов хорошо описан, а размер клеток сопоставим с наночастицами. При этом скрининг агентов, способных связывать и модифицировать бактериальную мембрану, является весьма актуальной задачей, обусловленной ростом числа резистентных к действию антибиотиков инфекций в мире [Tasconelli et al., 2018].

Один из наиболее значимых возбудителей внутрибольничных инфекций *Acinetobacter baumannii* характеризуется природной резистентностью ко многим антибиотикам, а также способностью к приобретению вторичной устойчивости к разным классам антибактериальных препаратов, дезинфицирующим средствам и антисептикам, толерантностью к детергентам, ультрафиолетовому облучению и высушиванию, способностью к образованию биопленок на различных биотических и абиотических поверхностях [Tasconelli et al., 2018]. Наиболее острой проблемой в настоящее время является стремительно растущая устойчивость госпитальных штаммов *A. baumannii* к карбапенемам - препаратам выбора для лечения тяжелых нозокомиальных инфекций. В частности, в Российской Федерации устойчивость к карбапенемам у *A. baumannii* достигла уровня 80%, а доля экстремально резистентных штаммов превышает 60% [Сухорукова М.В., et al., 2017]. Бактериофаги являются естественными регуляторами численности популяции микроорганизмов, разнообразие их в природе чрезвычайно велико, как и число используемых ими стратегий инфицирования и уничтожения бактерий. Способность бактериофагов инфицировать бактериальные клетки, в первую очередь, зависит от их возможности распознавать специфические детерминанты на бактериальной поверхности, такие как белки, белковые структуры и капсульные полисахариды. Использование бактериофагов и специфических ферментов - фаговых деполимераз, способных распознавать и разрушать капсульные полисахариды, может быть достаточно эффективным подходом для контроля окруженных бактериальных клеток *A. baumannii* и формируемых ими биопленок, основным компонентом внеклеточного полимерного матрикса которых также являются экзополисахариды [Hua et al., 2018].

Ключевой задачей при изучении фаговых деполимераз для использования в противоинфекционной терапии является анализ их специфичности для определенных штаммов бактерий-патогенов [Pires et al., 2016]. Как правило, для ее решения применяются классические микробиологические методы, а именно нанесение раствора исследуемого фермента на бактериальный газон с последующей оценкой эффективности работы фермента по ореолу безкапсидных клеток. Такой подход требует временных затрат, а кроме того, достаточно плохо

масштабируется. Разработанный в настоящей работе метод теоретически позволяет осуществлять связывание бактериальных клеток с плазмонными частицами *in situ*, в коллоидном растворе. Для проверки данной гипотезы на поверхности AuNP был иммобилизован лектин WGA (англ. – wheat germ agglutinin), специфично связывающий N-ацетил-D-глюкозамин, один из основных компонентов бактериальной мембраны. При добавлении к раствору золотых наночастиц клеток *E. coli* происходил заметный и специфичный сдвиг спектра ЛППР по сравнению с контролем. Связывание частиц с бактериальной стенкой подтверждалось данными электронной микроскопии (Рисунок 10).

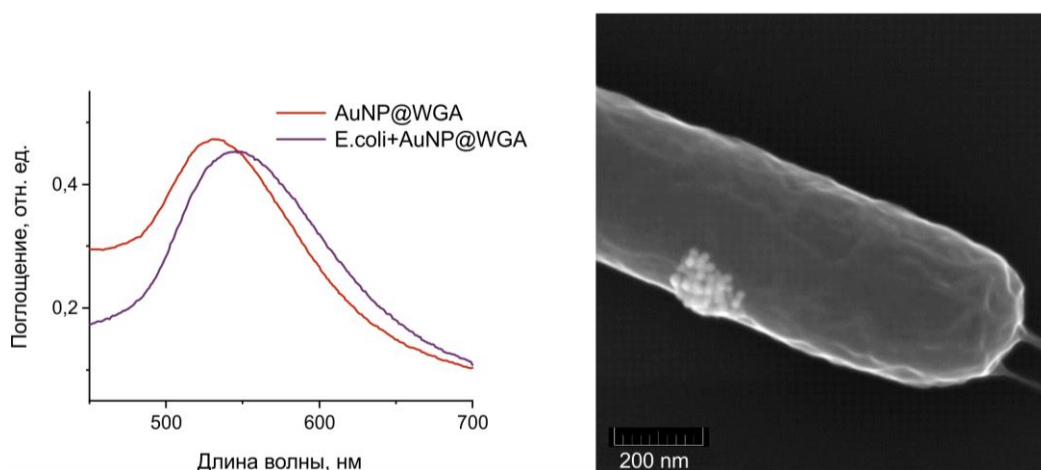


Рисунок 10. Анализ сдвига спектра ЛППР при связывании AuNP с иммобилизованным на них WGA (AuNP@WGA) на клеточной стенке *E. coli*. Слева – данные спектроскопии в видимом свете, справа – электронная микрофотография AuNP на поверхности *E. coli*.

При взаимодействии специфичных золотых наночастиц, функционализированных деполимеразой профага штамма *A. baumannii* 8300 (Dpo8300), с клетками специфичного штамма *A. baumannii* пик спектра экстинкции ЛППР спустя 10 минут значительно сдвигался в красную область с 530 до 545 нм ( $\Delta=15$  нм), чего не наблюдалось при их добавлении к клеткам *E. coli* либо при использовании наночастиц, конъюгированных со стрептавидином. Полученные данные свидетельствовали о возможности конъюгации фаговой деполимеразы на золотых наночастиц без потери функциональности и специфичности, а также возможности использования разработанного метода для оценки специфичности связывания литических ферментов с бактериальной мембраной. Результат был подтвержден классическим микробиологическим методом путем нанесения функционализированных золотых наночастиц на бактериальный газон. Интересно, что при взаимодействии специфичных золотых наночастиц с клетками *A. baumannii* спустя 35 минут возвращался к исходным значениям. Это может быть связано с тем, что при истощении субстрата происходила десорбция частиц с поверхности бактериальных клеток в результате нарушения нековалентной связи фермент-субстрат (Рисунок 11).

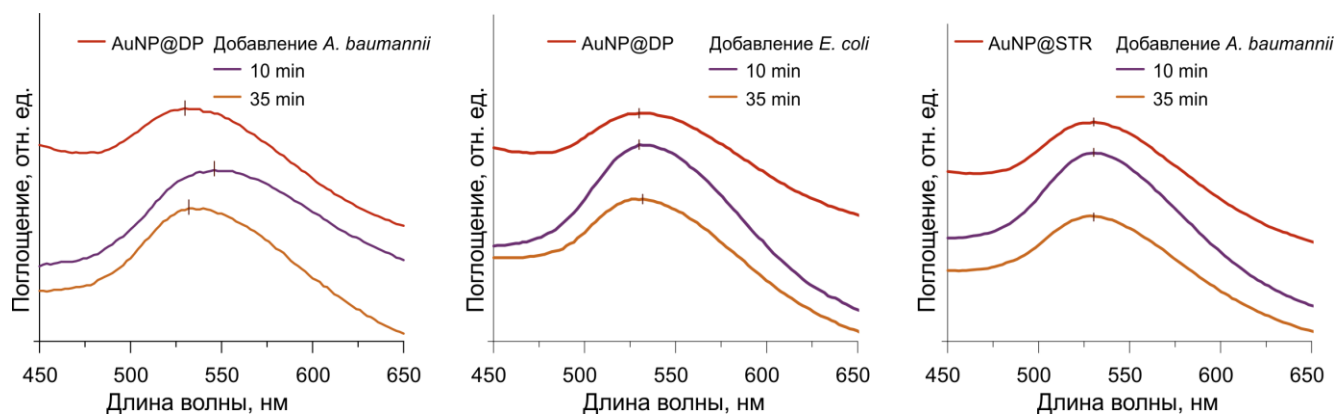


Рисунок 11. Оценка возможности создания и использования конъюгатов наночастиц с деполимеразам бактериофагов для скрининга их активности относительно патогенных штаммов бактерий. Слева – добавление специфичных золотых наночастиц с иммобилизованной на них Дро8300 к клеткам *A. baumannii*; центр – добавление неспецифичных золотых наночастиц с иммобилизованной на них Дро8300 к клеткам *E. coli*; центр – добавление неспецифичных золотых наночастиц с иммобилизованным на них стрептавидином к клеткам *A. baumannii*.

Для определения оптимального соотношения бактериальных клеток и функционализированных золотых наночастиц для проведения анализа специфичности иммобилизованных деполимераз бактериофагов был проведен ряд экспериментов по варьированию концентраций составляющих системы. Изменение концентрации AuNP при фиксированной концентрации бактериальных клеток предсказуемо изменяло форму и максимум кривой спектра экстинкции. При концентрациях золотых наночастиц в растворе ниже 2 pM их плотность связывания с бактериальной мембраной оказывалась недостаточной для сдвига резонанса, оптимальной является концентрация 8,3 pM (Рисунок 12).

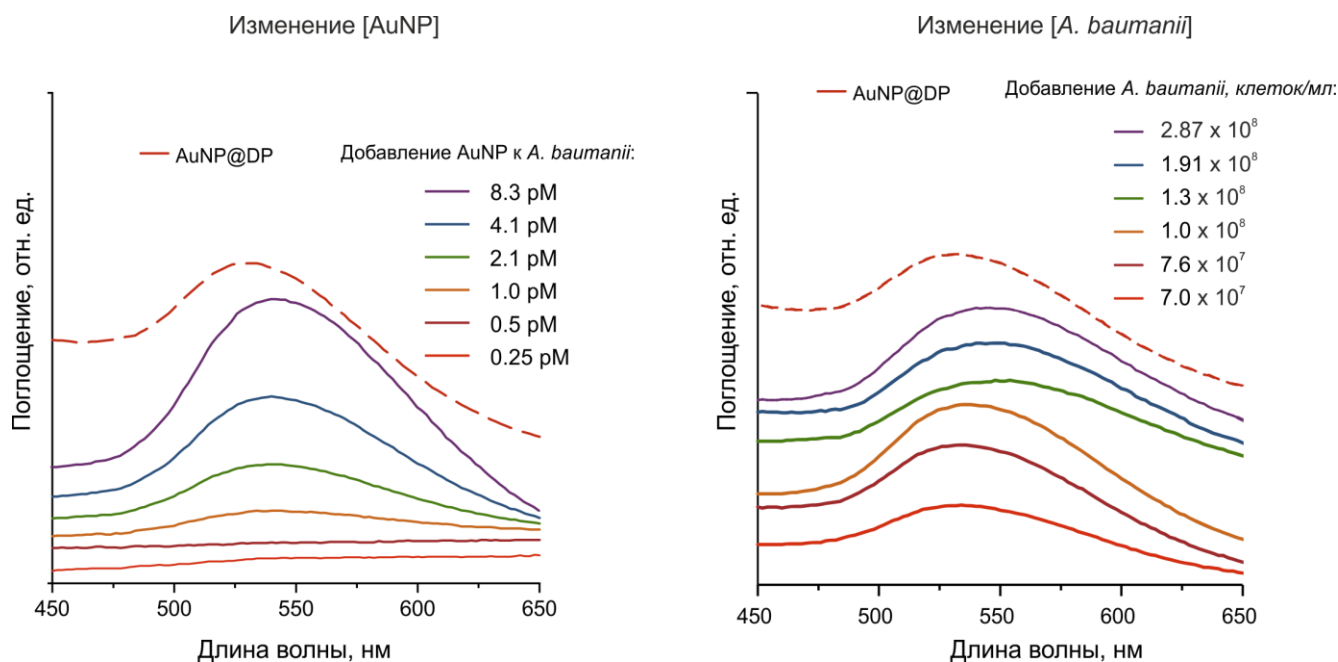


Рисунок 12. Зависимость формы и положения локального максимума спектра экстинкции ЛППР при фиксированной концентрации бактерий в растворе и переменной концентрации золотых наночастиц (слева), и при переменной концентрации бактериальных клеток в растворе и фиксированной концентрации наночастиц (справа).

Несмотря на возрастающий интерес к фаговым деполимеразам и разработке антибактериальной терапии на их основе, эти ферменты остаются все ещё малоизученными. Данные по их структуре и молекулярному механизму действия носят неполный характер и требуют дополнения. То же относится к основным биохимическим параметрам их работы, таких как аффинность. Отчасти, это связано со сложностью их получения и специфичностью субстрата. В рамках данной работы была предпринята попытка оценить кинетику связывания и диссоциации золотых частиц, функционализированных новой деполимеразой профага штамма *A. baumannii* 8300, клеточной стенки *A. baumannii*. При связывании фермента субстратом происходит сдвиг плазмонного резонанса более чем на 10 нм в красную область, что связано с максимальным заполнением клеточной стенки функционализированными золотыми частицами. Время полунасыщения кривой составляет 38 секунд. Далее, по мере активности фаговых деполимераз происходит истощение субстрата, при этом сам фермент также необратимо меняет свою конформацию. В этот момент происходит диссоциация золотых наночастиц, сопровождаемая сдвигом спектра в синюю область. Данный процесс напрямую зависит от ферментативной кинетики деполимераз и, как предполагается, его скорость коррелирует с ней. Время полунасыщения кривой составляет согласно полученным данным 47,6 секунд. Полученные данные являются принципиально новыми для данной области.

## ВЫВОДЫ

1. Разработан и описан новый неинвазивный метод исследования гетерогенных лиганд-зависимых самособирающихся комплексов наночастиц на основе количественной оценки сдвига максимума спектра экстинкции локализованного поверхностного плазмонного резонанса в ходе их сборки и разборки, позволяющий оценивать кинетику данных процессов. Показана возможность неинвазивного получения уникальной информации о состоянии наносистем в режиме реального времени без введения меток либо длительной пробоподготовки.
2. Создана новая безметочная система типа сенсор-актюатор на основе локализованного поверхностного плазмонного резонанса, позволяющая селективно и обратимо метить молекулярные мишени. Разработанная система обладает широким динамическим диапазоном и подходит для использования *in situ*, что отличает её от большинства сенсоров на основе плазмонного резонанса.
3. Показана возможность использования разработанного метода оценки взаимодействия золотых наночастиц с неплазмонными объектами на примере специфичности связывания функционализированных деполимеразой профага штамма *A. baumannii* 8300 (Dpo8300) золотых наночастиц с определенными штаммами бактерий.
4. На модели деполимеразы профага штамма *A. baumannii* 8300 (Dpo8300) была продемонстрирована возможность использования сдвига локализованного поверхностного плазмонного резонанса для оценки кинетики связывания и диссоциации литических ферментов на поверхности наночастиц со своими мишенями на поверхности клеток.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

По результатам диссертации подготовлено к публикации 7 печатных работ, индексируемых базами Scopus и Web of Science.

Перечень подготовленных к публикации работ по теме диссертации:

1. Shevchenko, K.G., Cherkasov, V.R., Tregubov, A.A., Nikitin, P.I., Nikitin, M.P. Surface plasmon resonance as a tool for investigation of non-covalent nanoparticle interactions in heterogeneous self-assembly & disassembly systems // Biosens. Bioelectron. 2017. Т. 88. С. 3-8
2. Shevchenko, K.G., Cherkasov, V.R., Nikitina, I.L., Babenyshev, A.V., Nikitin, M.P. Smart multifunctional nanoagents for in situ monitoring of small molecules with a switchable affinity towards biomedical targets // Appl. Nanosci. 2018a. Т. 8. № 1–2. С. 195–203.3
3. Cherkasov V.R., Shevchenko K.G., Nikitin P.I. Optical method for studying self-Assembly of various nanoparticles in liquids // Proceedings - 2016 International Conference Laser Optics, LO 2016., 2016.
4. Shevchenko, K.G., Cherkasov, V.R., Sokolov, I.L., Nikitin, M.P. Stimuli-responsive nano-and microstructures based on gold nanoparticles // Proceedings - 2016 International Conference Laser Optics, LO 2016., 2016.
5. Babenyshev, A.V., Shevchenko, K.G., Tregubov, A.A., Nikitina, I.L., Cherkasov, V.R. Nanocomplexes for in situ detection of small molecules with switchable optical properties // Proceedings - International Conference Laser Optics 2018, ICLO 2018. , 2018.
6. Shevchenko, K.G., Babenyshev, A.V., Tregubov, A.A., Nikitina, I.L., Cherkasov, V.R. Development of SPR based tool for monitoring of self-assembly of heterogenous nanoparticle complexes // Proceedings - International Conference Laser Optics 2018, ICLO 2018., 2018.
7. Shevchenko, K.G., Lunin, A.V., Popova, A.V., Kolychev, E.L., Gorshkov, B.G., Nikitin, M.P. Development of the SPR based method for real-time monitoring of surface cell markers density. Selected abstracts from the 26th Conference of the European Cell Death Organization (ECDO): Cell death in disease — from small molecules to translational medicine // Cell Death Discov. 2019. Vol. 5, № 1. P. 1–48.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Canfarotta F. et al. Specific Drug Delivery to Cancer Cells with Double-Imprinted Nanoparticles against Epidermal Growth Factor Receptor // *Nano Lett.* 2018. T. 18. № 8. С. 4641–4646.
2. Dykman L., Khlebtsov N. Gold nanoparticles in biomedical applications: recent advances and perspectives // *Chem. Soc. Rev.* 2012. T. 41. № 6. С. 2256–2282.
3. Grzelczak M. et al. Directed Self-Assembly of Nanoparticles // *ACS Nano.* 2010. T. 4. № 7. С. 3591–3605.
4. Homola J., Piliarik M. Surface Plasmon Resonance (SPR) Sensors. , 2006. С. 45–67.
5. Hua Y. et al. Phage Therapy as a Promising New Treatment for Lung Infection Caused by Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* in Mice // *Front. Microbiol.* 2018. T. 8.
6. Khlebtsov N.G. Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from Extinction Spectra // *Anal. Chem.* 2008. T. 80. № 17. С. 6620–6625.
7. Kumar C.S.S.R., Mohammad F. Magnetic nanomaterials for hyperthermia-based therapy and controlled drug delivery // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2011. T. 63. № 9. С. 789–808.
8. Kutuzov S. et al. On the kinetics of nanoparticle self-assembly at liquid/liquid interfaces // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2007. T. 9. № 48. С. 6351.
9. Lim J. et al. Characterization of magnetic nanoparticle by dynamic light scattering // *Nanoscale Res. Lett.* 2013. T. 8. № 1. С. 381.
10. Luo B. et al. Quantifying the Self-Assembly Behavior of Anisotropic Nanoparticles Using Liquid-Phase Transmission Electron Microscopy // *Acc. Chem. Res.* 2017. T. 50. № 5. С. 1125–1133.
11. Mayer K.M., Hafner J.H. Localized Surface Plasmon Resonance Sensors // *Chem. Rev.* 2011. T. 111. № 6. С. 3828–3857.
12. Nie Z., Petukhova A., Kumacheva E. Properties and emerging applications of self-assembled structures made from inorganic nanoparticles // *Nat. Nanotechnol.* 2010. T. 5. № 1. С. 15–25.
13. Nikitin M.P. et al. Biocomputing based on particle disassembly. // *Nat. Nanotechnol.* 2014. T. 9. № 9. С. 716–22.
14. Pires D.P. et al. Bacteriophage-encoded depolymerases: their diversity and biotechnological applications // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2016. T. 100. № 5. С. 2141–2151.
15. Rechberger W. et al. Optical properties of two interacting gold nanoparticles // *Opt. Commun.* 2003. T. 220. № 1–3. С. 137–141.
16. Shevchenko K.G. et al. Surface plasmon resonance as a tool for investigation of non-covalent nanoparticle interactions in heterogeneous self-assembly & disassembly systems // *Biosens. Bioelectron.* 2017. T. 88. С. 3–8.
17. Shevchenko K.G. et al. Smart multifunctional nanoagents for in situ monitoring of small molecules with a switchable affinity towards biomedical targets // *Appl. Nanosci.* 2018. T. 8. № 1–2. С. 195–203.
18. Sokolova V. et al. Characterisation of exosomes derived from human cells by nanoparticle tracking analysis and scanning electron microscopy // *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2011. T. 87. № 1. С. 146–150.
19. Tacconelli E. et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis // *Lancet Infect. Dis.* 2018. T. 18. № 3. С. 318–327.
20. Turkevich J., Stevenson P.C., Hillier J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold // *Discuss. Faraday Soc.* 1951. T. 11. С. 55.
21. Tyrrell Z.L., Shen Y., Radosz M. Fabrication of micellar nanoparticles for drug delivery through the self-assembly of block copolymers // *Prog. Polym. Sci.* 2010. T. 35. № 9. С. 1128–1143.
22. Wang Z.L. Transmission Electron Microscopy of Shape-Controlled Nanocrystals and Their Assemblies // *J. Phys. Chem. B.* 2000. T. 104. № 6. С. 1153–1175.
23. Сухорукова М.В., Эйдельштейн М.В., Склеенова Е.Ю., Иванчик Н.В., Шек Е.А., Дехнич А.В., Козлов Р.С., Розанова Софья Марковна, Перевалова Е.Ю., Яранцева Н.З., Новикова Р.И., Молдовану М.Г., Валиуллина И.Р., Насыбуллова З.З., Архипенко М.В., Адонина Е.Э., П Я.О. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *Acinetobacter* spp. В стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования «марафон» 2013-2014 // *КМАХ.* 2017. Т. 1.