

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
_____ Т. Г. Волова
«__» _____ 2023 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

06.03.01 Биология

Антимикробные свойства наночастиц металлов и композитных материалов
на основе полигидроксиалканоатов и антибиотиков

Руководитель	_____	д.б.н., профессор	С. В. Прудникова
	подпись, дата	должность, ученая степень	инициалы, фамилия
Выпускник	_____		Е. В. Василенко
	подпись, дата		инициалы, фамилия
Рецензент	_____	к.б.н., с.н.с.	Г. И. Антонов
	подпись, дата	должность, ученая степень	инициалы, фамилия

Красноярск 2023

РЕФЕРАТ

Магистерская диссертация на тему «Антимикробные свойства наночастиц металлов и композитных материалов на основе полигидроксиалканоатов и антибиотиков» содержит 71 страницу текстового документа, 20 рисунков, 2 таблицы, 5 приложений, 118 использованных источников.

НАНОЧАСТИЦЫ СЕРЕБРА, НАНОЧАСТИЦЫ ОКСИДА МЕДИ, АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ, МИНИМАЛЬНАЯ ИНГИБИРУЮЩАЯ КОНЦЕНТРАЦИЯ, ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТЫ, АНТИБИОТИКИ, КОНТРОЛИРУЕМАЯ ДОСТАВКА.

Объекты исследования:

– коллоидные растворы наночастиц металлов (Ag, CuO),
– биополимеры поли(3-гидроксibuтират-со-3-гидроксивалерат) и поли(3-гидроксibuтират-со-4-гидроксibuтират), нагруженные антибиотиками. Тестовые культуры микроорганизмов – бактерии *Micrococcus luteus*, *Bacillus mycooides*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* и грибы *Rhodotorula mucilaginosa*, *Candida albicans*.

В задачи исследования входило определение минимальной ингибирующей концентрации (МИК) растворов наночастиц; исследование антимикробных свойств растворов методом агаровых лунок; оценка антимикробных свойств плёнок и нетканого материала, нагруженных антибиотиками, диско-диффузионным методом.

Установлена МИК раствора наносеребра для бактерий *M. luteus*, *P. aeruginosa* и раствора наночастиц оксида меди в отношении бактерий *M. luteus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. mycooides*, *S. aureus* и гриба *R. mucilaginosa*. Бактерицидное действие растворов проявлялось при концентрации 4 г/л. При исследовании раствора наночастиц серебра методом агаровых лунок, наиболее чувствительными оказались грамположительные бактерии *M. luteus* и *S. aureus*, грамотрицательные бактерии показали слабую чувствительность.

Плёнки и нетканый материал на основе сополимеров поли(3-гидроксibuтирата) с 3-гидроксивалератом [П(ЗГБ-со-ЗГВ)] или 4-гидроксibuтиратом [П(ЗГБ-со-4ГБ)] являются эффективной матрицей для доставки антибиотиков. Размер зон отсутствия роста бактерий *E. coli* и *S. aureus* не зависел от типа материала, а изменялся в зависимости от чувствительности бактерий к антимикробным препаратам.

Оглавление

Введение.....	5
Глава 1. Обзор литературы.....	7
1.1. Общий механизм действия металлических наночастиц.....	7
1.2. Характеристика и свойства наночастиц серебра.....	9
1.3. Методы получения наночастиц серебра.....	9
1.3.1. Химические методы получения наносеребра.....	10
1.3.2. Физические методы получения наносеребра.....	11
1.3.3. Биологические методы получения наносеребра.....	11
1.4. Антимикробные свойства наночастиц серебра.....	13
1.4.1. Антибактериальная активность наночастиц серебра.....	14
1.4.3. Противогрибковая активность наночастиц серебра.....	17
1.5. Применение наночастиц серебра в биологии и медицине.....	18
1.6. Характеристика и свойства наночастиц оксида меди.....	20
1.7. Методы получения наночастиц оксида меди.....	21
1.7.1. Химические методы получения наночастиц оксида меди.....	21
1.7.2. Физические методы получения наночастиц оксида меди.....	22
1.7.3. Биологические методы получения наночастиц оксида меди.....	23
1.8. Антимикробные свойства наночастиц оксида меди.....	25
1.8.1. Антибактериальная активность наночастиц оксида меди.....	25
1.8.2. Противогрибковая активность наночастиц серебра.....	27
1.9. Применение наночастиц оксида меди в биологии и медицине.....	28
1.10 Системы контролируемой доставки лекарств на основе полигидроксиалканоатов.....	29
Глава 2. Объекты и методы исследования.....	31
2.1. Объекты исследования.....	31
2.2. Методы получения и характеристика наночастиц серебра и оксида меди.....	31
2.3. Методы получения плёнок и нетканых материалов из полигидроксиалканоатов, нагруженных антибиотиками.....	33
2.3.1. Пленки.....	33
2.3.2. Нетканый материал.....	34

2.3.3. Характеристика антибиотиков	34
2.4. Методы исследования антимикробной активности растворов наночастиц и биodeградируемых материалов на основе ПГА.....	35
2.4.1. Оценка антимикробной активности растворов наночастиц в жидкой питательной среде.....	35
2.4.2. Оценка антимикробной активности растворов наночастиц на агаризованной питательной среде.....	37
2.4.3. Оценка антимикробной активности плёнок и нетканых материалов на агаризованной питательной среде.....	38
Глава 3. Результаты.....	39
3.1. Оценка антибактериального действия коллоидного раствора наночастиц серебра.....	39
3.2. Оценка антимикробного действия коллоидных растворов наночастиц оксида меди.....	44
3.3. Оценка антибактериального действия плёнок из полигидроксиалканоатов с антибиотиками	46
3.4. Оценка антибактериального действия нетканого материала из сополимера поли(3-гидроксibuтирата-со-4-гидроксibuтирата), нагруженного антибиотиками	50
Выводы	52
Список использованных источников	54
ПРИЛОЖЕНИЕ А	67
ПРИЛОЖЕНИЕ Б.....	68
ПРИЛОЖЕНИЕ В	69
ПРИЛОЖЕНИЕ Г.....	70
ПРИЛОЖЕНИЕ Д.....	71

Введение

Проблема устойчивости к антибиотикам приобретает в настоящее время особенно важное значение в связи с распространением новых механизмов резистентности среди штаммов-возбудителей инфекционных заболеваний. Проблема антибиотикорезистентности заставляет искать другие способы борьбы с микроорганизмами, включая применение новых антимикробных агентов и разработку новых эффективных лекарственных форм.

Металлические частицы, в частности наночастицы серебра (AgNPs) и оксида меди (CuONPs), находятся в фокусе внимания из-за их антимикробной активности в форме ионов металлов, в то время как антибиотики теряют свою эффективность из-за развития устойчивых штаммов микроорганизмов. Это ценное свойство стало особенно актуальным, ведь в настоящее время появляется все больше штаммов болезнетворных бактерий, устойчивых к антибиотикам узкого спектра действия [1].

Наночастицы металлов достаточно малы, они способны проникать сквозь клеточные мембраны и изнутри влиять на внутриклеточные процессы, такие как репликация ДНК, деление клеток и метаболизм [2]. К тому же, ионы металлов очень токсичны для бактериальных клеток и накапливают супероксиды и гидроксильные радикалы, приводящие к окислительному стрессу. Наночастицы серебра и оксида меди являются перспективным антибактериальным средством, т.к. микроорганизмы не способны вырабатывать резистентность к наночастицам металлов, следовательно, не передают устойчивость потомству в ходе мутаций.

Одним из способов, повышающих эффективность антимикробных препаратов, является применение систем контролируемой доставки лекарственных средств (СКДЛ), которые обеспечивают поступление антибиотиков непосредственно в зону воспаления в терапевтической

концентрации и снижают побочное действие лекарств на организм человека [3]. Важным аспектом при изготовлении таких антими­кробных препаратов стал подбор матрицы для депонирования лекарственного средства, при этом предпочтение отдают биосовместимым материалам, которые не вызывают токсичности. Поли­гидроксиалканоаты (ПГА) являются подходящим средством для адресной доставки лекарств, учитывая их высокую нагрузочную способность, биосовместимость, способность к биологическому разложению и контролю скорости выхода препарата.

Целью данной работы являлось исследование антибактериальных свойств коллоидных растворов наночастиц металлов (серебра и оксида меди), а также биоразлагаемых полимерных материалов на основе ПГА, нагруженных антибиотиками.

В задачи исследований входило:

1. Оценить антими­кробные свойства растворов наночастиц серебра и оксида меди в отношении тестовых культур бактерий – *Escherihia coli* ATCC 25922, *Bacillus mycoides*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 и дрожжевых грибов – *Rhodotorula mucilaginosa*, *Candida albicans* методом агаровых лунок.

2. Определить минимальные ингибирующие концентрации растворов наночастиц серебра и оксида меди в отношении тестовых культур микроорганизмов на жидких питательных средах.

3. Оценить антими­кробные свойства плёнок из сополимеров поли(3-гидроксибутирата-со-3-гидроксивалерата) и поли(3-гидроксибутирата-со-4-гидроксибутирата), нагруженных антибиотиками дорипенем, цефтазидим, хлоргексидин и стрептоцид, в отношении тестовых культур бактерий *Escherihia coli* и *Staphylococcus aureus* диско-диффузионным методом.

4. Оценить антими­кробные свойства нетканого материала из сополимера поли(3-гидроксибутирата-со-4-гидроксибутирата), нагруженного антибиотиками цефтазедим и дорипенем, в отношении тестовых культур бактерий *Escherihia coli* и *Staphylococcus aureus*.

Глава 1. Обзор литературы

1.1. Общий механизм действия металлических наночастиц

Металлические наночастицы (metal nanoparticles, M-NPS) представляют собой неорганические частицы размером от 1 до 100 нм различной формы (например, сферические, треугольные, листы, пластины, трубки, кубы и стержни). Недавние исследования показали, что на антибактериальные эффекты M-NPS могут влиять многие факторы, такие как их размер, заряд, морфология и структура поверхности [6]. Небольшой размер M-NPS имеет большое преимущество для достижения сильной антимикробной активности в борьбе с бактериями. Например, меньшие M-NPS обычно обладают более высокой антибактериальной активностью из-за их относительно большего отношения поверхности к объему, что увеличивает их способность продуцировать активные формы кислорода (АФК), и которые могут повреждать бактериальные биомолекулы, белки и липиды. Такие наночастицы прикрепляются к мембране бактерий посредством электростатических взаимодействий, сил Ван-дер-Ваальса, рецептор-лиганд или гидрофобных взаимодействий [4]. После установления контакта M-NPs могут проникать через бактериальную мембрану, препятствовать метаболическим путям и вызывать изменения формы и функции мембраны. Оказавшись внутри клеток, M-NPs могут ингибировать ферменты, дезактивировать белки, индуцировать окислительный стресс и изменять уровни экспрессии генов. Накопление металла внутри микроорганизма считается ключевым этапом токсичности металлов. Важно отметить, что механизмы действия не являются исключительными, поскольку антибактериальная активность является сложным результатом множества и часто взаимосвязанных механизмов, которые происходят одновременно.

Основными способами действия являются (рис.1): (1) высвобождение ионов металлов из металлических наночастиц и (2) прямое взаимодействие

ионов металлов и/или (3) металлических наночастиц с клеточной стенкой посредством электростатических взаимодействий, что приводит к нарушению функции мембраны и нарушению усвоения питательных веществ; (4) образование внеклеточных и внутриклеточных активных форм кислорода (АФК), а также повреждение липидов, белков и ДНК в результате окислительного стресса; (5) высокие уровни связывания металлов с оболочкой клетки и высокие уровни АФК могут привести к повреждению плазматической мембраны и, таким образом, привести к утечке содержимого клетки; (6, 7) при поглощении металла наночастицы металлов и ионы металлов могут напрямую взаимодействовать как с белками, так и с ДНК, ухудшая их функции и нарушения клеточного метаболизма в дополнение к опосредованной металлом продукции АФК [5].

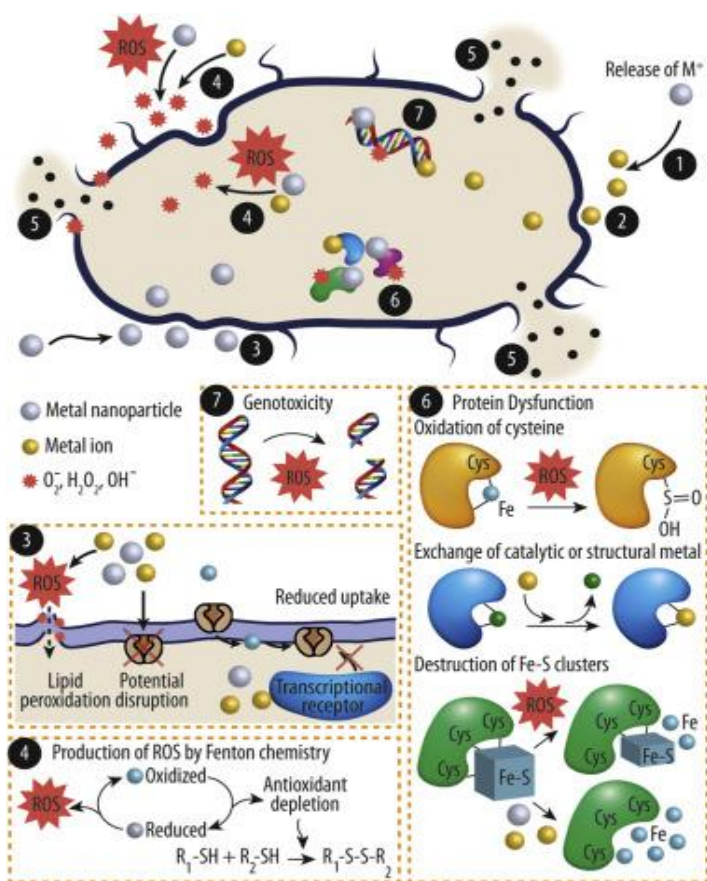


Рисунок 1 – Основные способы действия металлических наночастиц на клетки [5].

Более того, небольшой размер ионов металлов и М-NPs позволяет им наносить как внеклеточные, так и внутриклеточные повреждения, а поскольку ионы металлов и наночастицы обладают высокой стабильностью, они могут быть нацелены на другие бактериальные клетки, как только они высвобождаются из уже убитых бактерий [7].

1.2. Характеристика и свойства наночастиц серебра

Наночастицы серебра, как и другие наночастицы, характеризуются уникальными свойствами, связанными с высоким отношением их поверхности к объему, что определяет большую эффективность их действия. Наиболее эффективны для уничтожения болезнетворных микроорганизмов частицы серебра размером 9-15 нм [8]. Они имеют чрезвычайно большую удельную площадь поверхности, что улучшает бактерицидные свойства, поскольку увеличивается площадь контакта серебра с бактериями или вирусами.

Для обозначения частиц серебра используются различные термины, такие как коллоидное серебро, наносеребро, наночастицы серебра (AgNPs). В небольших концентрациях серебро безопасно для клеток человека, но губительно для большинства бактерий и вирусов. Действие ионов серебра распространяется более чем на 650 видов бактерий (для сравнения – спектр действия любого антибиотика 5–10 видов бактерий). Наночастицы серебра атакуют большое количество разнообразных белковых объектов в клетке, поэтому является маловероятным, что микроорганизмы способны выработать резистентность к серебру во время мутаций [9].

1.3. Методы получения наночастиц серебра

Уникальность антисептических свойств наносеребра привела к поиску наиболее совершенных методов синтеза этих наночастиц. За последние

двадцать лет значительно увеличилось число работ, посвященных получению и изучению свойств наночастиц серебра [10]. Они могут быть синтезированы различными методами (рис. 2), включая химический синтез [11], физические методы [12], зеленый синтез (биологические методы) [13].

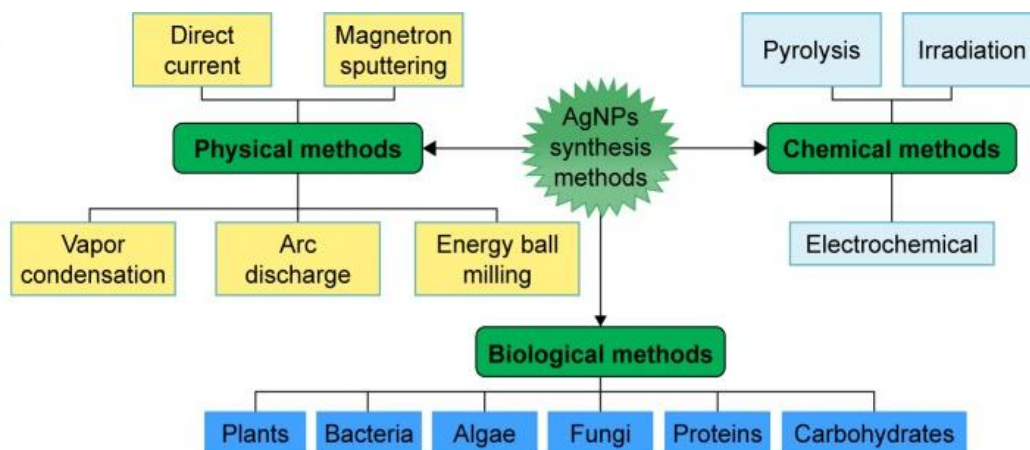


Рисунок 2 – Методы синтеза наносеребра [14]

1.3.1. Химические методы получения наносеребра

Химические методы синтеза наночастиц серебра можно подразделить на химическое восстановление [15], электрохимические методы [16], и пиролиз [17]. Например, используя подход электрохимического метода, можно получить малогабаритные (10-20 нм) наночастицы серебра сферической формы [18]. Кроме того, с использованием кристаллов цеолита путем электрохимического восстановления были образованы монодисперсные наносфероиды серебра размером 1-18 нм [19].

В химическом методе основным недостатком является использование крайне вредных органических растворителей. Эти растворители обладают более низкой биосовместимостью, что ограничивает их естественное применение.

1.3.2. Физические методы получения наносеребра

Физические методы не используют токсичных химикатов и обычно требуют быстрой обработки. К таким методам относятся конденсация пара [20], дуговая разрядка [21], метод энергетической шаровой мельницы [22] и магнетронное распыление постоянного тока [23]. Еще одно преимущество физических методов состоит в том, что образующиеся AgNPs имеют узкое распределение по размерам. Как правило, эти методы быстры, и получаются узконаправленные наноструктурные композиции [24]. Однако физические методы имеют некоторые недостатки, такие как расход большого количества энергии [25] и требование большего времени для термостабильности [26].

1.3.3. Биологические методы получения наносеребра

В биологическом синтезе AgNPs токсичные восстановители и стабилизаторы заменяются нетоксичными молекулами (белками, углеводами, антиоксидантами и т.д.), продуцируемыми живыми организмами, включая бактерии [27], грибы [28], и растения [29]. Доступные и распространенные системы растений, такие как лемонграсс, алоэ вера, водоросли, люцерна, чай, горчица, были также исследованы для синтеза наночастиц серебра. Возможные механизмы биологического синтеза включают ферментативное (например, НАДФН-редуктазу) и неферментативное восстановление. В целом синтез AgNPs с использованием растительных экстрактов является наиболее распространенным экологически чистым методом производства.

Растительное производство – одно из наиболее экономически выгодных и ценных альтернативных методов синтеза AgNPs. Исследователи сосредоточились на синтезе AgNPs различного размера и формы с использованием растительных экстрактов с широким спектром антимикробной, противоопухолевой, противовирусной активности. Сильную активность в отношении штаммов бактерий *Bacillus cereus* и *Staphylococcus*

aureus проявляют наночастицы серебра, синтезированные из листьев *Euphorbia hirta*, размером 40-50 нм [30]. Krishnaraj et al. и Veerasamy et al. смогли синтезировать AgNPs размером 20-30 и 35 нм соответственно, используя экстракты листьев лекарственных растений *Acalypha indica* и *Garcinia mangostana* [31, 32].

Chandran et al. [33] и Li et al. [34] синтезировали наночастицы серебра из экстрактов листьев растений алоэ вера и стручкового перца. Так же наночастицы серебра были синтезированы из фруктового экстракта папайи *Carica*, и было установлено, что синтезированные AgNPs являются высокотоксичными в отношении различных патогенов человека с множественной лекарственной устойчивостью [35].

Наночастицы серебра были синтезированы и с использованием как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий, включая устойчивые к серебру бактерии для образования AgNPs [36]. Некоторые бактерии способны производить внеклеточные AgNPs, в то время как другие могут синтезировать внутриклеточные AgNPs, а *Calothrix pulvinata*, *Anabaena flos-aquae* [37], *Vibrio alginolyticus* [38], *Aeromonas* spp. SH10 [39], *Plectonema boryanum* UTEX 485 [40], и *Lactobacillus* spp. [41] обладают способностью продуцировать как внеклеточные, так и внутриклеточные AgNPs.

Грибы также способны продуцировать биосовместимые наноструктуры, имеющие терапевтические свойства. Синтез наночастиц серебра на основе грибов также является экологически чистым и недорогим. В недавнем исследовании сообщалось о штаммах грибов *Penicillium expansum* HA2N и *Aspergillus terreus* HA1N, для синтеза AgNPs. С помощью просвечивающей электронной микроскопии установили, что из *P. expansum* были получены AgNPs длиной 14-25 нм, и 10-18 нм AgNPs были получены из *A. terreus*. Эффективность этих AgNPs была изучена против различных видов грибов, которые продемонстрировали их сильный противогрибковый потенциал [42].

Наночастицы серебра сферической формы могут быть синтезированы с использованием *Coriolus versicolor*, но восстановление AgNPs длится долго (72 ч); однако продолжительность может быть уменьшена до 1 ч путем использования щелочных сред при pH 10. Щелочные среды играют жизненно важную роль в биологическом восстановлении ионов серебра, гидролизе воды и взаимодействии с белковыми функциями. Кроме того, группа S–H из белка играет важную роль в биовосстановлении, тогда как молекула глюкозы играет значительную роль в снижении AgNPs [43].

Преимущество биологических методов перед физико-химическими заключается в том, что они не требуют вредных растворителей, в то время как биополимеры играют важную роль в качестве стабилизирующих и восстановительных агентов [44]. Зеленый синтез также имеет другие преимущества, такие, как более высокая стабильность в течение длительного времени, и является легким, биосовместимым и экономически эффективным, а биогенно синтезированные наноструктуры широко применяются в биомедицинской области. Однако основным недостатком этого метода является очистка. Во время процедуры очистки существует вероятность бактериального заражения и трансфекции, что может рассматриваться как основное ограничение в их биомедицинском применении [44].

Коллоиды с частицами наносеребра обладают специальными оптическими свойствами – при разных размерах частиц цвет у них различается. По мере увеличения размера частицы (с 20 нм до 200 нм), цвет меняется следующим образом: желтый – зеленый – бурый – серый.

1.4. Антимикробные свойства наночастиц серебра

Наночастицы серебра обладают бактерицидным, противогрибковым и противовирусным действием, служат эффективным обеззараживающим средством в отношении патогенных микроорганизмов. Среди металлов серебро обладает наиболее сильным бактерицидным действием. При этом

взаимодействие не самого металла, а его ионов с клетками микроорганизмов вызывает их гибель. Исследования показали, что чувствительность разных патогенных и непатогенных организмов к серебру неодинакова. Патогенная микрофлора намного чувствительнее к ионам серебра, чем непатогенная. Поэтому серебро действует избирательно, в большей степени уничтожая вредные микроорганизмы [45].

1.4.1. Антибактериальная активность наночастиц серебра

S. Rajeshkumar et al. установили, что наночастицы серебра в сочетании с антибиотиками, демонстрируют ингибирование устойчивых к пенициллину, ампициллину и новобиоцину бактериальных штаммов – *B. subtilis*, *Bacillus sp.*, *S. nematodiphila* и *Streptococcus sp.* [46]. Эти частицы были получены методом биосинтеза из супернатанта бактерий *Enterococcus sp.*, выделенных из морской воды. Большинство частиц имели сферическую форму и размер от 10 до 80 нм.

В другом исследовании сообщается об изготовлении нановолоконных каркасов поли-ε-капролактона (PCL) с частицами наносеребра, имеющих антибактериальную активность в отношении грамотрицательных и грамположительных бактерий [47]. Такие гибридные нановолоконные каркасы PCL-AgNPs были подготовлены с целью придания нановолокнам PCL антибактериальной активности для улучшения терапевтических свойств при использовании в медицине. Диско-диффузионным методом на питательном агаре было показано, что диски из нановолокон, содержащие разные концентрации AgNPs, проявляли антибактериальную активность, в отличие от чистого нановолокна без серебра. Для *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae* и *P. aeruginosa*, ингибирование было прямо пропорционально концентрации AgNPs. Грамотрицательные бактерии (*E. coli*, *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae*) были более чувствительными к нановолокнам PCL-AgNPs по сравнению с грамположительными (*S. aureus*, *S. mutans* и *B. subtilis*) [47].

Наночастицы серебра размером 5 нм в комплексе с антибиотиками были протестированы против патогенных бактерий. Результаты показали, что эффективность антибиотиков в отношении тест-штаммов увеличивалась в присутствии AgNPs. Активность наносеребра с ампициллином была более выражена в отношении грамотрицательных бактерий *Shigella flexneri* и *P. aeruginosa*, а комплекс наносеребра и ванкомицина – в отношении грамположительных бактерий *Streptococcus pneumoniae* и *S. aureus*. Эти антибиотики демонстрировали более высокую антимикробную эффективность в сочетании с AgNPs. Такие результаты позволили предположить, что AgNPs может быть использован в качестве адъюванта для лечения различных инфекционных заболеваний, вызванных бактериями [48].

В исследованиях, проведенных Elangovan et al., показано, что наибольшая эффективность наночастиц серебра была обнаружена в отношении *S. aureus* и *E. coli*. Умеренная активность была получена в отношении *Salmonella typhi*, *M. luteus* и *P. aeruginosa* [49].

Существует множество теорий (ферментативные, адсорбционные, электростатические, мутагенные), объясняющих механизм воздействия ионов серебра на клетку бактерий. Однако наиболее распространенной в настоящее время является адсорбционная теория [50]. Основной смысл теории в том, что бактериальная клетка теряет жизнеспособность в результате взаимодействия электростатических сил, возникающих между обладающей отрицательным зарядом клеточной мембраной и положительно заряженными ионами Ag^+ при адсорбции последних бактериальной клеткой. Ионы серебра способны адсорбироваться бактериальной мембраной, реагируя с клеточной мембраной бактерий, состоящей из бактериальных белков – пептидогликанов – гетерополимеров N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмурамовой кислоты, обеспечивающих механическую прочность и структурно-функциональные свойства мембран бактерий и простейших. В этом процессе ионы Ag^+ взаимодействуя с карбоксильными и аминокетильными группами пептидогликанов, формируют металлопротеиновые комплексы, что является

следствием изменения структуры и устойчивости пептидогликанов. Это лишает их способности транспортировать кислород внутрь бактериальной клетки, что приводит к кислородному голоданию и последующей гибели микроорганизма. Аналогичное ингибирующее воздействие оказывает серебро и на дыхательные ферменты микроорганизмов, встраиваясь в реакционный центр ферментов и изменяя его.

Со структурной точки зрения наночастицы серебра имеют размер в диапазоне от 1 до 100 нм и, что более важно, по мере уменьшения размера частиц значительно увеличивается отношение площади поверхности к объему. Как следствие, физические, химические и биологические свойства заметно отличаются от свойств исходного сыпучего материала.

Способность наночастиц серебра физически взаимодействовать с поверхностью клеток особенно важна в случае грамотрицательных бактерий. Во многих исследованиях наблюдалась адгезия и накопление наночастиц на бактериальной поверхности. Структурные повреждения клеточных мембран приводят к повышению проницаемости бактерий, что в свою очередь так же зависит от размеров наночастиц [51, 52]. Исследования с использованием *Escherichia coli* подтвердили, что накопление наночастиц серебра на мембране клетки создает разрывы целостности бислоя, что предрасполагает ее к повышению проницаемости и гибели бактериальных клеток [53].

В другом исследовании [54], было показано разрушение клетки у *Pseudomonas aeruginosa* в случае добавления наночастиц серебра (рис. 3). Таким образом, добавление наночастиц серебра оказывало пагубное влияние на морфологические свойства клеток *P. aeruginosa*, приводя к ингибированию роста клеток в обработанных наночастицами культурах.

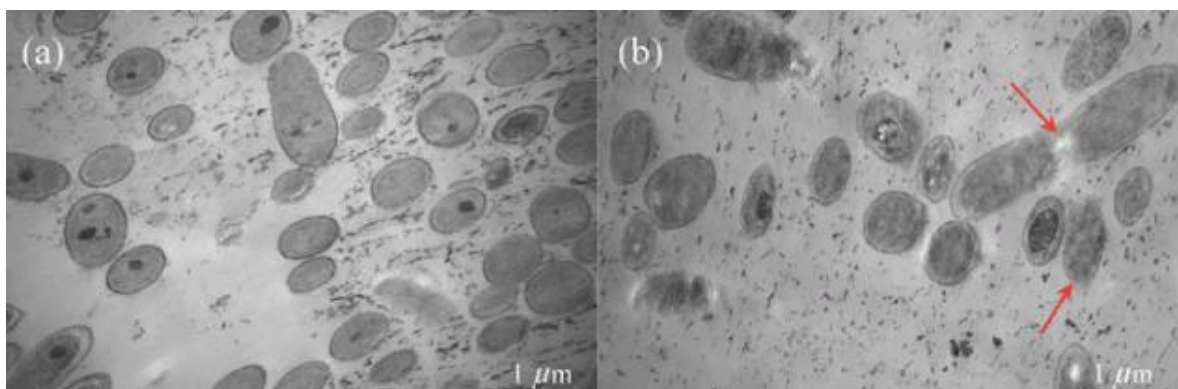


Рисунок 3 – Изображения *P. aeruginosa*, полученные с помощью просвечивающей электронной микроскопии при экспозиции 6 ч в отсутствие (а) и присутствии (б) наночастиц серебра ($2,5 \text{ мг л}^{-1}$). Стрелки указывают на клетки с поврежденной мембраной или лизированные [54].

1.4.3. Противогрибковая активность наночастиц серебра

В 2008 году Kim et al. продемонстрировали потенциал наночастиц серебра против 44 штаммов, а именно *Candida tropicalis*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* и *Trichophyton mentagrophytes*. Штаммы *T. mentagrophytes* и *Candida* spp. проявляли чувствительность по отношению к наночастицам серебра [55]. Аналогичным образом Velluti et al. обнаружили, что комплексы наносеребра $[\text{Ag}_2(\text{SMX})_2]$ проявляют хорошую активность в отношении 10 штаммов грибов, а именно *C. tropicalis* (C 131), *C. albicans* (ATCC 10231), *Cryptococcus neoformans* (ATCC 32264), *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9763), *A. fumigatus* (ATCC 26934), *A. flavus* (ATCC 9170), *Aspergillus niger* (ATCC 9029), дерматофиты, включая *Trichophyton rubrum* (C 113), *T. mentagrophytes* (ATCC 9972) и *Microsporum gypseum* (C 115) [56].

Gajbhiye et al. сообщили об эффективности биогенных AgNPs против *Pleospora herbarum*, *Phoma glomerata*, *Fusarium semitectum*, *Trichoderma* spp., и *C. albicans*. Кроме того, они также сообщили о синергических эффектах AgNPs в сочетании с флуконазолом [57]. В 2009 году Jo et al. продемонстрировали противогрибковый потенциал ионов серебра и

наночастиц против двух фитопатогенных грибов – *Magnaporthe grisea* и *Bipolaris sorokiniana* [58]. Фунгицидный потенциал AgNPs в сочетании с различными гетероциклическими соединениями и производными пиридазина был изучен в отношении *C. albicans* и *A. flavus*, и было обнаружено, что AgNPs в сочетании с новыми гетероциклическими соединениями обладают значительной фунгицидной активностью против исследуемых организмов.

В 2015 году для изучения противогрибковой активности AgNPs были отобраны шесть видов грибов, а именно *Penicillium brevicompactum*, *A. fumigatus*, *Mortierella alpina*, *C. cladosporoides*, *Chaetomium globosum* и *Stachybotrys chartarum*. Темпы роста всех испытанных видов грибов, кроме *Mortierella* spp., замедлялись добавлением AgNPs. Каждый гриб проявлял отчетливую реакцию на применяемые AgNPs в зависимости от концентрации и скорости высвобождения ионов Ag в окружающую среду [59].

Наночастицы серебра могут нарушать целостность мембраны и подавлять нормальный процесс почкования у дрожжей. Наночастицы серебра приводят к образованию активных форм кислорода (АФК), к которым паразиты лейшмании, простейшие, проявляют чувствительность [60]. Исследования AgNPs, связанные с противогрибковой и антипротозойной активностью, проводятся очень редко, поэтому необходимы дальнейшие исследования для описания подробных противогрибковых и антипротозойных механизмов.

1.5. Применение наночастиц серебра в биологии и медицине

Применение наночастиц серебра как биоцидной добавки широко распространено для создания и производства новых материалов, покрытий с биоцидными свойствами. Преимущество наносеребра перед всеми существующими антимикробными средствами обуславливается широким спектром антимикробной активности. Так же, микроорганизмы не способны

вырабатывать резистентность к наночастицам серебра, поэтому не передают устойчивость потомству в ходе мутаций.

Производство текстильной и полимерной продукции медицинского, бытового назначения, модифицированной наночастицами серебра, является одним из перспективных направлений, так как такие материалы могут быть использованы в качестве профилактических антимикробных средств защиты в местах, где возрастает опасность распространения инфекции. AgNPs широко используются в медицинских приборах и потребительских товарах, таких как хирургические инструменты, стерилизаторы, медицинские катетеры, кремы, лосьоны, спреи, бытовая техника, игрушки, моющие средства, зубные пасты, мыла, контейнеры для хранения продуктов и консервации, а также антисептические краски [14].

С целью изучения антибактериальных эффектов наносеребра проводились исследования, которые показывают его эффективность не только в растворах, но и при нанесении на хлопчатобумажные изделия [61].

Для культур *P. phoeniceum* и *S. aureus* антибактериальный эффект проявлялся уже при концентрации наносеребра 1 мкг/см² на поверхности хлопчатобумажной ткани и 0,8 мкг/см² в водорастворимой краске. Повышение концентрации наносеребра в водорастворимой краске/хлопчатобумажной ткани до 7 мкг/см² обеспечивало также подавление роста культур *B. subtilis* и *E. coli*. Было показано, что при 60-дневном систематическом использовании волокнистого сорбента, покрытого наночастицами наносеребра, в качестве бытового фильтра для очистки воды на нем не наблюдалось роста биопленок. Таким образом, наночастицы серебра в качестве добавки к водорастворимым краскам, текстильным тканям и волокнистым сорбентам обладают выраженным антибактериальным/противогрибковым эффектом [61].

Кроме того, несколько исследователей показали, что AgNPs и композиты серебра обладают способностью катализировать химические реакции, например, окисление CO [62], окисление бензола до фенола [63].

1.6. Характеристика и свойства наночастиц оксида меди

Использование наночастиц оксида меди экспоненциально возросло за последнее десятилетие в различных областях применения (таких как промышленные катализаторы, газовые датчики, электронные материалы, биомедицина, восстановление окружающей среды) благодаря их гибким свойствам, то есть большому соотношению площади поверхности к объему. На наноуровне CuO характеризуется стабильностью и длительным сроком хранения [64].

Оксид меди также обладает антимикробными, противогрибковыми свойствами, магнитным фазовым переходом, газочувствительностью, биоцидными, сверхпроводящими, каталитическими свойствами [65].

Благодаря небольшому размеру наночастицы оксида меди (CuONPs) могут легко проникать внутрь бактериальной клетки через клеточную мембрану. Карбоновая и аминная группы, присутствующие в мембране бактериальной клетки, помогают эффективно притягивать ионы меди. Токсичность CuONPs сильно варьируется в зависимости от размера и формы частиц [66]. CuNPs и CuONPs вызывают накопление активных форм кислорода, которые могут разрушать клеточную мембрану и вызывать прямую клеточную токсичность, и в конечном итоге лизис клеток [67].

Медь обладает большим окислительно-восстановительным потенциалом, который может выступать в качестве донора или акцептора электронов, образуя ионы Cu. Эти ионы очень токсичны для бактериальных клеток и накапливают супероксиды и гидроксильные радикалы, приводящие к окислительному стрессу. Эти АФК могут влиять на клеточные процессы бактерий, такие как репликация ДНК, деление клеток и метаболизм [68]. Токсичность, опосредованная CuONPs в бактериальных клетках, способствует деградации митохондрий, рибосом и различных белковых каналов, присутствующих в мембране бактериальной клетки [69].

1.7. Методы получения наночастиц оксида меди

Подходы к синтезу наночастиц CuO значительно продвинулись за последние десять лет благодаря их важному биомедицинскому и промышленному применению [70]. Технология синтеза важна для свойств конечного продукта, поскольку она может контролировать размер и морфологию наночастиц. Кроме того, эти наночастицы обладают различными оптическими и магнитными свойствами, механической прочностью и удельным электрическим сопротивлением, которые отличаются от характеристик объемного твердого материала.

Наночастицы оксида меди могут быть синтезированы различными методами, например, химическими, физическими и биологическими. Физико-химические методы являются дорогостоящими, выделяют высокотоксичные химические вещества в окружающую среду и потребляют много энергии. Напротив, биологический метод является экологически чистым, экономически эффективным, надежным, удобным и простым способом синтеза наночастиц оксида меди [71].

1.7.1. Химические методы получения наночастиц оксида меди

CuONPs изготавливаются различными физико-химическими методами, такими как золь-гель метод [72], сонохимический метод [73], электрохимический метод [74], микроволновое облучение [75], метод твердофазной реакции [76].

Электрохимический способ получения наночастиц CuO, основан на окислении и диспергировании медных электродов в нейтральном растворе хлорида натрия под действием переменного импульсного тока (ПИТ-синтез). Особенностью способа является возможность управления составом и структурой наночастиц оксидов меди путем варьирования параметров тока [77]. Zhang Q. et al. синтезировали наночастицы CuO веретенообразной и

стержневидной формы, варьируя плотность от $5 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$ до $10 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$, а затем до $20 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$. Изменив электролитический растворитель, эти авторы получили наностержни CuO диаметром от 20 до 50 нм и длиной от 200 до 300 нм [78]. Jadhav S. et al. также синтезированы наночастицы CuO электрохимическим методом с использованием медного листа в качестве анода и платинового листа в качестве катода [79].

Метод прямого термического разложения также широко используется для синтеза CuONPs. Один из подходов заключается в добавлении карбоната натрия к сульфату меди, и при прокаливании образуются сферические наночастицы CuO [80]. Доказано, что наночастицы CuO обладают улучшенными свойствами, которые могут быть полезны в их биомедицинском применении. Например, такие наноструктуры обладают повышенной антимикробной активностью в отношении бактерий, устойчивых к лекарственным средствам, сохраняя при этом приемлемую биосовместимость и небольшие размеры [81].

1.7.2. Физические методы получения наночастиц оксида меди

Способы физического синтеза включают импульсную лазерную абляцию, дуговой разряд, пиролиз распылением, измельчение шариками, парогазовую фазу, импульсное удаление проволоки, литографию и т.д [69].

В работе [82] автор представил тонкую пленку на основе CuO, нанесенную с использованием технологии магнетронного распыления, которая является типичным методом физического осаждения из паровой фазы. Процесс распыления проводился в условиях высокого вакуума/сверхвысокого вакуума при различных температурах, включая охлаждение и нагрев образцов. Он обладает многими преимуществами, такими как простота в эксплуатации, большой диапазон нанесения и низкая

стоимость при крупномасштабном производстве плотных и однородных пленок.

Другим методом, используемым для осаждения CuO, является термическое окисление, которое очень похоже на магнетронное распыление, с той разницей, что сначала осаждается затравочный слой Cu, а затем образцы окисляются в печи в потоке чистого кислорода при более высоких температурах (для CuO обычно это 400 °C). Термическое окисление дает возможность получать CuO в виде нанопроволоки, в то время как магнетронное распыление обычно создает тонкие пленки [83]. Оба метода требуют высококлассного оборудования, что является их главным недостатком.

1.7.3. Биологические методы получения наночастиц оксида меди

Биологический синтез использует биологический принцип окисления и восстановления с помощью микробных ферментов или фитохимических веществ растений [69]. Как физические, так и химические методы имеют недостатки, такие как низкая производительность, неэкологичность, токсичность и капиталоемкость. По этим причинам биологический синтез пытается заменить химические методы получения NPS. Кроме того, зеленый метод синтеза является простым, экономически эффективным, надежным, устойчивым и относительно воспроизводимым, что приводит к получению более стабильных соединений.

Синтез наночастиц с использованием растительного экстракта имеет преимущества перед методами биологического синтеза. Синтез наночастиц металлов с помощью растительного экстракта является значительно более быстрым [84, 85] и чрезвычайно монодисперсным [86] по сравнению с другими биологическими методами [87]. Основные проблемы, связанные с использованием микроорганизмов, включают токсичность определенных бактерий, процедуру выделения микроорганизмов и утомительную

процедуру инкубации, которые делают их непригодными для многих исследователей. Таким образом, растительные экстракты являются замечательным источником синтеза наночастиц металлов и оксидов металлов [87, 88]. Растительные компоненты, такие как плоды, листья, стебли и корни, часто используются для экологически чистого производства наночастиц благодаря высококачественным фитохимическим веществам, которые они генерируют. Растительный экстракт вырабатывает электроны, которые приводят к восстановлению солей меди. Наночастицы оксида меди образуются, когда фитохимические вещества вступают в реакцию с ионами меди, что приводит к восстановлению.

Так же для синтеза наночастиц оксида меди использовались различные виды грибов [89]. Грибы, по сравнению с другими микробами, обладают большим потенциалом для производства наночастиц. Для биогенного получения наночастиц бесклеточные экстракты микроорганизмов действуют как восстанавливающие, каталитические или укупоривающие агенты [89]. Виды *Trichoderma* продуцируют широкий спектр биологически активных метаболитов, включая пироны, поликетиды, терпены, дикетопиперазин, гликолипиды и большое количество восстановительных ферментов, которые помогают в производстве не только наночастиц CuO, но также наночастиц Ag и ZnO [90].

Грибы используют как внутренние, так и внешние пути для создания различных наночастиц. Размер наночастиц, образующихся внутри видов грибов, может быть меньше, чем те, которые образуются внеклеточным путем, при более высокой дисперсности и размерах [91]. Для синтеза наночастиц в основном использовался внеклеточный путь грибов, поскольку грибы выделяют несколько типов метаболитов, которые функционируют как восстанавливающие и стабилизирующие агенты для образования наночастиц [92]. Наночастицы оксида металла, в частности наночастицы оксида меди, были синтезированы с использованием нескольких штаммов грибов. Грибы являются отличными кандидатами, поскольку они выделяют огромное

количество ферментов и с ними легче работать в лаборатории. *Penicillium aurantiogriseum*, *Penicillium citrinum* и *Penicillium waksmanii* - все они продуцируют CuNPs внеклеточно [93].

1.8. Антимикробные свойства наночастиц оксида меди

В последние несколько десятилетий наночастицы металлов и оксидов металлов используются для лечения различных бактериальных и вирусных заболеваний. Антибиотики и другие лекарственные препараты на основе наночастиц обладают потенциальной активностью в лечении заболеваний. Cu и CuONPs обладают огромной антимикробной активностью в отношении различных бактериальных патогенов как человека, так и растений [94]. CuONPs обладает рядом уникальных свойств, таких как небольшой размер, большая площадь поверхности, биосовместимость, высокая биологическая и химическая реактивность, которая помогает эффективно уничтожать бактериальные клетки [69].

1.8.1. Антибактериальная активность наночастиц оксида меди

Синтезированные зеленым методом Cu и CuONPs проявляли потенциальную антибактериальную активность в отношении синегнойной палочки, *Clostridium difficile*, золотистого стафилококка *S. aureus* и кишечной палочки *Escherichia coli* [95, 71]. Изготовление CuNPs с использованием экстракта листьев *Gloriosa superba* показало ингибирование грамположительных бактерий *Staphylococcus aureus* и грамотрицательных бактерий *Klebsiella aerogenes* [96]. Было обнаружено, что CuONPs, покрытый *S. acuta*, может подавлять как грамположительные, так и грамотрицательные бактерии при нанесении на хлопчатобумажные ткани [97].

Ионы меди очень токсичны для бактериальных клеток, они способны накапливать супероксиды и гидроксильные радикалы, приводящие к окислительному стрессу. Эти АФК могут влиять на клеточные процессы бактерий, такие как репликация ДНК, деление клеток и метаболизм [95]. Токсичность, опосредованная CuONP в бактериальных клетках, способствует деградации митохондрий, рибосом и различных белковых каналов, присутствующих в мембране бактериальной клетки. Точный механизм антимикробной активности все еще находится в стадии изучения.

Антибактериальная активность наночастиц CuO различна в зависимости от особенностей бактериальных клеток. Например, их клеточные стенки, по-видимому, влияют на антимикробный эффект CuONPs, причем ключевым аспектом является грамположительность [70]. Сообщалось, что 100% клеток *E. coli*, которые являются грамотрицательными, погибали при использовании концентраций CuONPs выше 9,5%, в то время как для грамположительных видов *S. aureus* антимикробная способность была ниже [98]. Также сообщалось, что наночастицы CuO ингибируют рост *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* и *S. aureus* в зависимости от времени, при этом используемая доза, конечно, является наиболее важным фактором [99].

Goyal R. et al. также сообщается, что антимикробные свойства зависят от свойств поверхности и размера наночастиц. По-видимому, мелкие частицы с большой площадью поверхности обладают лучшей антибактериальной активностью по сравнению с более крупными. Наночастицы CuO проявили значительную антимикробную активность также в отношении *Bacillus subtilis* [100]. El-Nahhal et al. протестирована антибактериальная активность хлопчатобумажных повязок с покрытием CuONPs и хлопчатобумажных повязок с покрытием из наночастиц CuS. На оба покрытия были нанесены *E. coli* и *S. aureus*, чтобы сравнить антимикробный эффект двух систем покрытия на грамотрицательной и грамположительной моделях соответственно. Результаты показали, что

образец с наночастицами CuO проявлял более высокую антибактериальную активность, чем образец, покрытый наночастицами CuS, которые не показали снижения жизнеспособности тестируемых бактерий [101]. Devi A. et al. изучали антимикробную активность наночастиц CuO в отношении *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella spp.*, и их действие было сопоставимо с антимикробной активностью гентамицина в отношении этих штаммов [102,96].

1.8.2. Противогрибковая активность наночастиц серебра

Несколько исследований показали, что CuONPs можно использовать в качестве противогрибкового средства, поскольку они могут подавлять некоторые патогенные грибы как у людей, так и у растений [103]. Однако необходимы дополнительные исследования, чтобы точно определить противогрибковые механизмы CuONPs и их будущее использование в качестве противогрибкового средства. Наночастицы CuONPs могут ингибировать рост нескольких патогенных штаммов грибов, таких как *Fusarium oxysporum*, *Alternaria solani*, *Aspergillus niger* и *Penicillium citrinum* [104]. CuONPs, синтезированные с использованием хитозана, проявляли противогрибковую активность в отношении патогенов растений томата *A. solani* и *F. oxysporum* [105]. Химически синтезированные CuONPs высокоэффективны против *Candida albicans* и *Aspergillus flavus* [106]. В другом отчете CuNPs продемонстрировал противогрибковую активность в отношении некоторых деструктивных патогенов сельскохозяйственных культур, таких как *Alternaria alternata*, *Curvularia lunata* [107]. Поскольку CuONP обладает потенциальными антимикробными и противогрибковыми свойствами, его также можно использовать для консервирования пищевых продуктов и их упаковки. Высокие концентрации меди обеспечивают прямую токсичность для нескольких микробов и грибов, вызывающих порчу пищевых продуктов [71].

1.9. Применение наночастиц оксида меди в биологии и медицине

Наночастицы оксида меди находят разнообразное научное применение. Они очень эффективны против различных патогенных микробов, кроме того, наночастицы CuO обладают противоопухолевой и противогрибковой активностью. Благодаря своей антимикробной активности, они также используются для консервирования пищевых продуктов и в сельском хозяйстве для защиты от различных патогенных грибов [96]. Биоремедиация на основе меди играет ключевую роль в очистке сточных вод и удалении тяжелых металлов из почвы. Медь является хорошим проводником электричества, поэтому она используется в качестве сверхпроводника и вносит значительный вклад в современную электронику.

CuONPs в настоящее время используются в текстильной промышленности для изготовления противомикробных средств индивидуальной защиты (СИЗ). В полимер ткани включены нанокomпозиты для изготовления антимикробных тканей. Входящие в состав хлопковых волокон CuNPs, проявляли антимикробную активность в отношении нескольких патогенных микробов [108]. Также CuONPs можно использовать для очистки загрязненной воды в различных промышленных зонах. Поскольку CuONPs имеет очень маленький размер, он может эффективно взаимодействовать с различными биомолекулами и может использоваться в качестве системы доставки лекарств [96].

Общие области применения оксида меди включают биомедицину (антимикробные, противообрастающие, противогрибковые средства, антибиотики, антиоксиданты, доставку лекарств и противораковые средства), текстильную промышленность, термочувствительные и проводящие материалы, газовые сенсоры, каталитические, синтез неорганических и органических наноразмерных композитов, магнитостойкие материалы, высокотемпературные сверхпроводники, восстановление окружающей среды, и т.д. [71].

Использование наночастиц CuO для доставки лекарств по-прежнему ограничено из-за повышенной токсичности, однако другие области применения, такие как перевязочные материалы и текстильные изделия с покрытием, представляют большой интерес в медицинской среде и других отраслях (например, косметическая, текстильная промышленность и т.д.). Основное применение таких составов основано на их антимикробной активности, что позволяет разрабатывать множество продуктов, от противомикробных растворов, используемых для дезинфекции поверхностей и медицинских устройств, до противомикробных повязок на раны, текстиля и покрытий [70]. Для улучшения их применения в области биомедицины исследователи стремятся найти оптимальные подходы к синтезу, чтобы снизить токсичность наночастиц CuO, но в то же время сохранить или даже повысить их эффективность в диагностике, терапии и, возможно, даже профилактике.

1.10 Системы контролируемой доставки лекарств на основе полигидроксиалканоатов

Системы контролируемой доставки лекарственных средств (СКДЛ) становятся все более эффективными с использованием современных технологий и методик для улучшения транспортировки, и высвобождения лекарственных средств после введения пациентам. Чтобы избежать нежелательных побочных эффектов и ускорить заживление, важно, чтобы концентрация препарата поддерживалась в оптимальном терапевтическом диапазоне, был подходящий способ введения и контролируемая скорость высвобождения препарата [109].

Полигидроксиалканоаты (ПГА) — это природные полимеры, вырабатываемые в определенных условиях определенными организмами, в первую очередь бактериями, в качестве источника энергии.

Полигидроксиалканоаты являются подходящим средством для адресной доставки лекарств, учитывая их высокую нагрузочную

способность, биосовместимость, отсутствие токсичности и способность к биологическому разложению. ПГА одерживают победу над другими биопластиками в области медицины, поскольку их мономеры - 3-гидроксимасляная кислота (ЗГБ) и 4-гидроксимасляная кислота (4ГБ) распознаются человеческим организмом как продукты распада, что удобно приводит к их быстрому естественному выведению из организма [110].

В последнее десятилетие наночастицы на основе ПГА в качестве носителей лекарственных средств привлекли значительное внимание при лечении различных заболеваний благодаря их потенциалу улучшать существующие системы доставки лекарств путем разработки новых лекарственных форм. Такие составы могли бы иметь лучший результат лечения, чем обычная терапия, благодаря их многообещающим физико-химическим свойствам [110], включая (а) способность преодолевать растворимость гидрофобных лекарственных средств, (b) их легко манипулировать для активного нацеливания, (с) стабилизация химиотерапевтических средств, (d) полная биосовместимость и неиммуногенность.

Однако наиболее заметный недостаток ПГА заключается в высоких производственных затратах, которые, в свою очередь, препятствуют коммерциализации ПГА. Это является причиной того, что ПГА, как правило, упускают из виду при использовании в медицине, несмотря на их идеальные свойства. Их высокая цена является следствием потребности в большом количестве из субстратов с высокой чистотой, а также их трудоемкое производство и последующая переработка. Чтобы исправить это, исследователи приступили к изучению более устойчивых альтернатив, таких как использование отходов в качестве источников углерода и замена химических методов извлечения биологическими.

Глава 2. Объекты и методы исследования

2.1. Объекты исследования

Объектами исследования в работе служили две группы материалов, обладающих антимикробными свойствами: 1) коллоидные растворы наночастиц серебра и оксида меди, 2) биоразлагаемые плёнки и нетканый материал из полигидроксиалканоатов разного химического состава, нагруженные антимикробными препаратами.

В качестве тест-объектов использовали референтные и типовые штаммы бактерий и дрожжевых грибов. Грамотрицательные бактерии – *Escherichia coli* ATCC 25922 и *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; грамположительные бактерии – *Bacillus mycoides*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; дрожжевые грибы – *Rhodotorula mucilaginosa* и *Candida albicans*.

2.2. Методы получения и характеристика наночастиц серебра и оксида меди

В работе были исследованы антимикробные свойства раствора наночастиц серебра (концентрация 0,054 мг/мл) и раствора наночастиц оксида меди (концентрация 1,095 мг/мл). Наночастицы были получены в Институте химии и химической технологии ФИЦ КНЦ СО РАН.

Раствор наночастиц серебра представлял собой коллоидный раствор серебра на водной основе, полученный методом восстановления нитрата серебра раствором цитратного комплекса железа (II). Синтез наночастиц серебра проводили по модифицированной методике Кэри Ли [111] при контролируемой температуре, скорости впрыска и скорости перемешивания. В реакционную ячейку загружали водные растворы Na_3Cit (0.6-1.8 М; 5 мл), FeSO_4 (0.6- 0.9 М; 5 мл) и $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (12 М; 0.0 – 0.25 мл) и термостатировали при температуре эксперимента 25 °С и скорости перемешивания 100 – 1000 об/мин в течение 5 мин, далее производили

инъекцию раствора AgNO_3 (0.05 – 0.6 М; 5 мл) со скоростью 1.0-25.0 мл/с, после чего реакционную смесь продолжали перемешивать еще в течение 5 мин. После смешивания реагентов наблюдалось осаждение черно-коричневого осадка агрегированных наночастиц серебра:



Для очистки полученный осадок собирали и центрифугировали в течение 10 мин с ускорением 1 – 600 g, осадок отделяли и растворяли в 5 мл воды, после чего добавляли раствор NaNO_3 (0.2 – 1.0 М; 5 мл) для осаждения частиц, снова центрифугировали и осадок растворяли в воде.

Полученный таким образом очищенный гидрозоль серебра был подвергнут дальнейшему изучению. Микрофотографии наночастиц были получены на электронном просвечивающем микроскопе HT7700 (Hitachi, Япония) с ускоряющим напряжением 110 кВ. Методом ПЭМ было показано, что в оптимальных условиях были получены чистые металлические частицы со средним размером 6.5 ± 1.8 нм (рис.4).

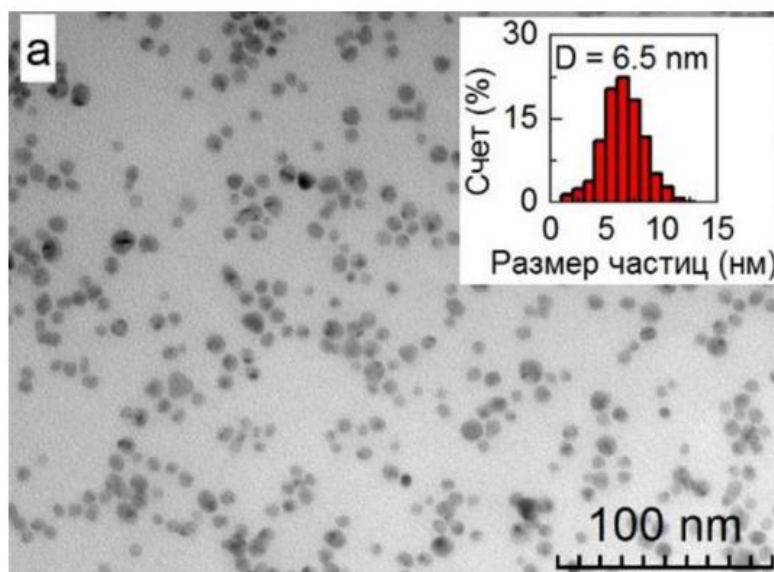


Рисунок 4 – Микрофотография ПЭМ с гистограммой распределения по размеру частиц серебра [111]

Наночастицы оксида меди были получены путем щелочного осаждения горячего раствора сульфата меди (II) гидроксидом натрия с одновременным разложением образующегося $\text{Cu}(\text{OH})_2$ до оксида [112]. Полученный осадок

CuO тщательно отмывали водой, стабилизировали путем внесения $6,3 \cdot 10^{-4}$ моль/г однозамещенного цитрата натрия и упаривали до конечной концентрации наночастиц 1000 г/л. По данным ПЭМ (рисунок 5 А), образец представлен анизотропными наночастицами со средней длиной 29 нм и диаметром 7 нм. Распределения частиц по диаметру и длине представлены гистограммами (рис.5 В, 5С).

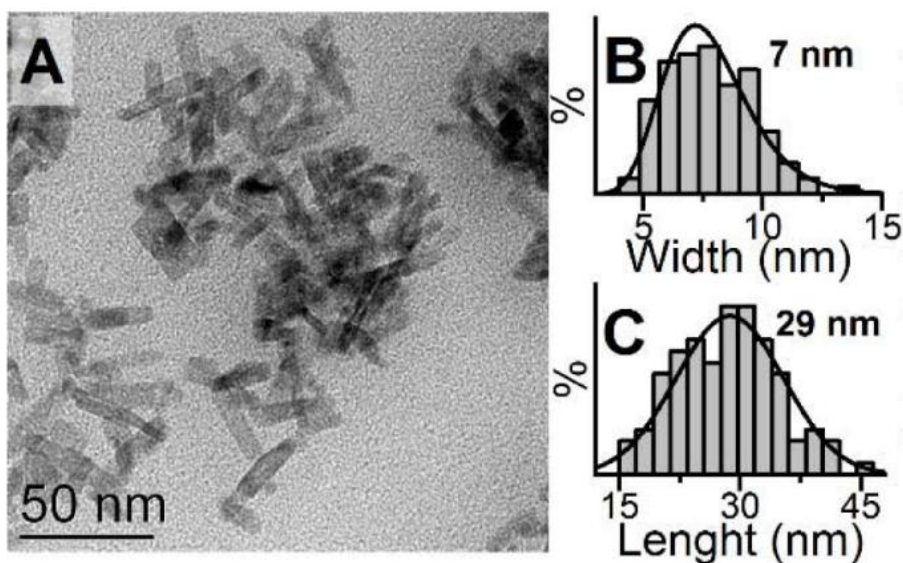


Рисунок 5 – Микрофотография образца наночастиц оксида меди (А); гистограммы распределения по длине и диаметру (В, С;) [112]

2.3. Методы получения плёнок и нетканых материалов из полигидроксиалканоатов, нагруженных антибиотиками

2.3.1. Пленки

Полимерные пленки, содержащие лекарственные препараты получены методом полива из раствора. Предварительно были приготовлены 2-% растворы полимеров П(3ГБ-со-3ГВ) и П(3ГБ-со-4ГБ) в хлороформе, содержащие лекарственный препарат (хлоргексидин, цефтазидим, дорипинем, стрептоцид). Содержание лекарственного препарата составило 10% от массы полимера. Растворы заливали в обезжиренные чашки Петри и высушивали до полного испарения растворителя в вакуумном десикаторе (Labconco, США) и хранили при 4° С. Затем из полученных пленок высекали

диски диаметром 5 мм и обеззараживали поверхности в ламинарном шкафу (Labconco, США) под УФ-лампой.

2.3.2. Нетканый материал

Ультратонкие мембраны, содержащие лекарственные препараты, были получены методом электростатического формования. Предварительно были приготовлены растворы полимера П(ЗГБ-со-4ГБ) с лекарственными препаратами. Для этого полимер и лекарственный препарат (цефтазидим или дорипинем) растворяли в 10 мл гексафтор-2-пропанол (ГФИП) для получения 7% раствора полимера. Содержание лекарственного препарата составило 10%. Далее, свежеприготовленный полимерный раствор с лекарственным препаратом переносили в шприц, установленный в горизонтальном положении в дозирующем устройстве. Процесс проводили при следующих параметрах: скорость подачи раствора 2 мл/ч; напряжение 30 кВ; расстояние между электродами от 250 мм. В качестве собирающей мишени использовали плоскую стальную пластину. Полученные образцы нетканых мембран высушивали до полного испарения растворителя в вакуумном дисикаторе (Labconco, США) и хранили при 4° С. Затем из полученных пленок высекали диски диаметром 5 мм и обеззараживали поверхности в ламинарном шкафу (Labconco, США) под УФ-лампой.

2.3.3. Характеристика антибиотиков

Стрептоцид: активное вещество – сульфаниламид. Химиотерапевтическое средство группы сульфаниламидов. Активен в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий. Оказывает бактериостатическое действие. Механизм действия – нарушение синтеза дигидрофолиевой и тетрагидрофолиевой кислоты, что приводит к нарушению синтеза нуклеиновых кислот [113].

Дорипенем: активное вещество – дорипенем. Синтетический антибиотик из группы карбапенемов широкого спектра действия, близкий по структуре к другим бета-лактамам антибиотикам. Дорипенем *in vitro* активен в отношении аэробных и анаэробных грамположительных и грамотрицательных бактерий. Оказывает бактерицидное действие за счет нарушения биосинтеза клеточной стенки бактерий [114].

Цефтазидим: активное вещество – цефтазидим. Антибиотик из группы цефалоспоринов III поколения. Обладает широким спектром и действует бактерицидно, нарушает синтез клеточной стенки микроорганизмов. Устойчив к действию большинства β -лактамаз [115].

Хлоргексидин: активное вещество – хлоргексидин. Антисептическое средство. Хлоргексидин проявляет бактерицидное действие в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, на споры бактерий действует только при повышенной температуре [116].

2.4. Методы исследования антимикробной активности растворов наночастиц и биodeградируемых материалов на основе ПГА

2.4.1. Оценка антимикробной активности растворов наночастиц в жидкой питательной среде

Минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) растворов определяли на суспензиях суточных культур тестовых микроорганизмов [74].

Для приготовления суспензии микроорганизмов в стерильную пробирку вносили 5 мл физраствора, в который помещали 1-2 петли суточной культуры бактерий, выращенных на скошенном питательном агаре, с таким расчетом, чтобы титр суспензии составил 1×10^8 клеток в 1 мл.

Оптическую плотность суспензий определяли с помощью денситометра DEN-1 (Biosan, Латвия), и доводили по стандарту мутности МакФарланда до 0,5 единиц, что соответствовало 1×10^8 клеток/мл.

Определение МИК проводили методом культивирования микроорганизмов в жидкой питательной среде. Для бактерий использовали мясопептонный бульон (Nutrient broth,), для дрожжевых грибов – жидкую среду Сабуро (Sabouraud Dextrose Broth, HiMedia, Индия). В пробирки вносили питательную среду и стерилизовали в автоклаве при 121 °С в течение 15 мин. В стерильную среду вносили 100 мкл суспензии микроорганизмов с титром 10^8 клеток в 1 мл и определенный объем исследуемых растворов для достижения соответствующих концентраций. Общий объем в пробирке доводили стерильным физиологическим раствором до достижения 10 мл.

Анализируемые концентрации растворов составляли 1, 2, и 4 г/л.

Далее пробирки инкубировали в термостате при 30°C. Анализировали рост в пробирках ежедневно в течение 3-х суток. Через 1-2 дня в пробирках был виден результат – помутнение бульона (рис. 6), что свидетельствовало о продолжении жизнедеятельности микроорганизмов. Визуальное отсутствие роста микроорганизмов свидетельствовало об ингибировании жизнедеятельности микроорганизмов и наличии антимикробного действия. Исследование проводили в 3-х повторностях.

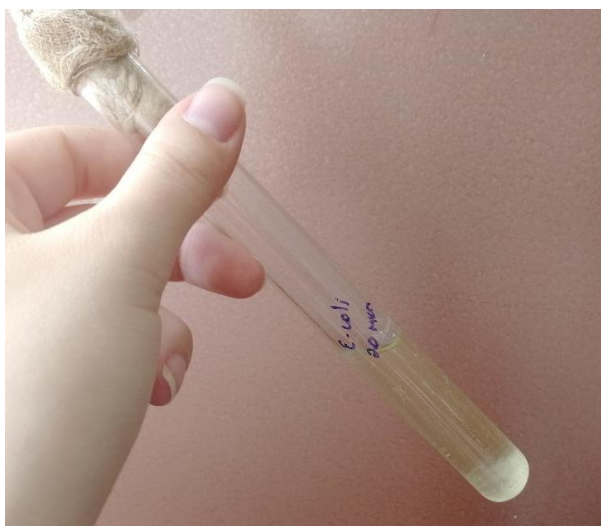


Рисунок 6 – Помутнение бульона с образованием белого хлопьевидного осадка при отсутствии антимикробного действия анализируемого раствора

Если рост в пробирках отсутствовал, проводили высев на агаризованную питательную среду Nutrient agar (HiMedia, Индия), чтобы установить характер действия растворов на бактерии. В случае возобновления роста микроорганизмов на питательном агаре в отсутствие анализируемого раствора, характер действия оценивали как бактериостатический (рис. 7А), если рост не возобновлялся – характер действия бактерицидный (рис. 7Б).

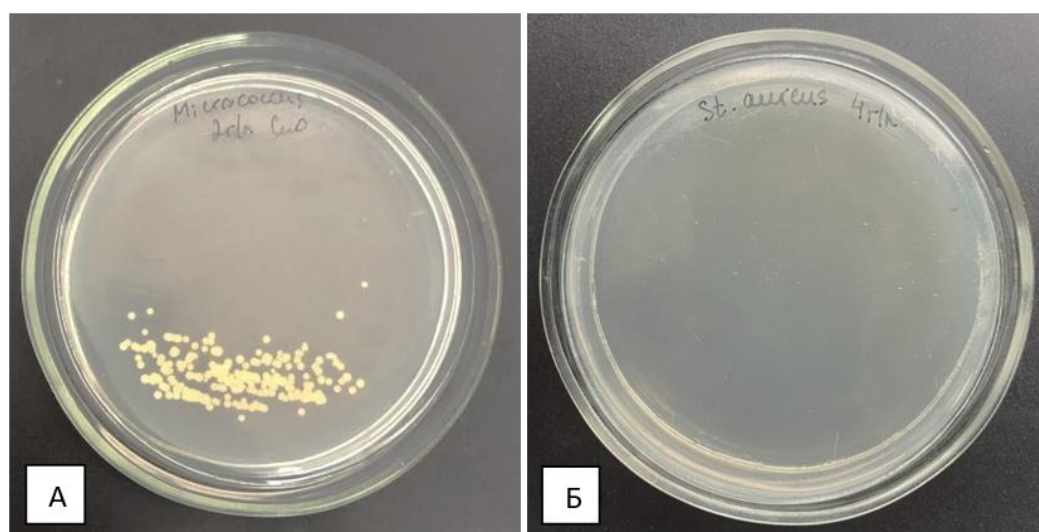


Рисунок 7 – Пример бактериостатического (а) и бактерицидного (б) действия испытуемых растворов

2.4.2. Оценка антимикробной активности растворов наночастиц на агаризованной питательной среде

Для определения антимикробной активности растворов использовали метод агаровых лунок, основанный на диффузии наночастиц в питательную среду [117]. Чашки Петри заполняли питательной средой слоем в 4-5 мм. Для засева бактерий использовали агар Мюллера-Хинтона (HiMedia, Индия), для посева дрожжевых грибов – агар Сабуро (HiMedia, Индия). После застывания агар подсушивали в термостате при 37°C в течение 20 мин. Посев суспензии микроорганизмов с титром 10^8 клеток в 1 мл осуществляли методом газона. Стерильным тампоном наносили подготовленную суспензию

микроорганизмов на поверхность агаровой среды частыми штриховыми движениями в трёх направлениях, каждый раз поворачивая чашку Петри на 60°. В питательном агаре пробивали лунки диаметром 5 мм и в каждую вносили по 50 мкл раствора наночастиц, после чего инкубировали 24 ч при 37 °С. После инкубации проводили определение диаметра зоны ингибирования роста, находя среднее значение, рассчитанное по 5-ти направлениям через центр лунки.

2.4.3. Оценка антимикробной активности плёнок и нетканых материалов на агаризованной питательной среде

Для исследования антибактериального действия плёнок и нетканых материалов, нагруженных антибиотиками, использовали диско-диффузионный метод [118]. Посев суспензии микроорганизмов (*E. coli* и *S. aureus*) с титром 10^8 клеток в 1 мл осуществляли методом газона. Стерильным тампоном наносили подготовленную суспензию микроорганизмов на поверхность агаровой среды частыми штриховыми движениями в трёх направлениях, каждый раз поворачивая чашку Петри на 60°. После посева тест-культуры на агар наносили диски диаметром 5 мм из плёнок П(ЗГБ-со-3ГВ) и П(ЗГБ-со-4ГБ) и нетканого материала П(ЗГБ-со-4ГБ), нагруженных разными антибиотиками – дорипенем, цефтазидим, хлоргексидин и стрептоцид, в концентрациях 1, 5 и 10%. После инкубации при 37°С в течение 24 ч, проводили определение диаметра зоны ингибирования роста, находя среднее значение, рассчитанное по 5-ти направлениям через центр лунки. Все исследования проводили в 3-х повторностях.

Глава 3. Результаты

Страницы 39-51 изъяты в связи с авторским правом

Выводы

1. Анализ раствора наночастиц серебра показал, что наиболее чувствительными оказались грамположительные бактерии *Micrococcus luteus* и *Staphylococcus aureus*, зоны ингибирования роста составили от 14.5 ± 0.5 мм при концентрации наносеребра 1 г/л и до 20.5 ± 1.0 мм при концентрации 4 г/л. Грамотрицательные бактерии показали слабую чувствительность к растворам AgNPs, при концентрации 4 г/л зоны ингибирования составили 11.5 ± 0.5 мм и 13.5 ± 0.5 мм для *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa*, соответственно.

Диаметры зон ингибирования роста гриба *Candida albicans* под действием растворов наносеребра составили от 10.5 ± 0.5 до 17.0 ± 1.0 мм.

В отношении дрожжевых грибов *Rhodotorula mucilaginosa* и бактерий *Bacillus mycoides* наночастицы серебра не проявили ингибирующего действия.

2. Минимальная ингибирующая концентрация раствора наносеребра для бактерий *Micrococcus luteus* составила 1 г/л, для *Pseudomonas aeruginosa* – 4 г/л, бактерицидное действие проявлялось при концентрации 4 г/л. Для остальных видов бактерий и дрожжевых грибов значения МИК не были достигнуты.

3. Минимальная ингибирующая концентрация наночастиц оксида меди в отношении бактерий *Micrococcus luteus* составила 2 г/л, в отношении *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus mycoides* и *Staphylococcus aureus* – 4 г/л, действие проявлялось как бактерицидное. Для гриба *Rhodotorula mucilaginosa* раствор оксида меди концентрацией 4 г/л оказал фунгистатическое действие. Для вида *Candida albicans* минимальная ингибирующая концентрация в эксперименте не была достигнута.

4. Плёнки и нетканый материал на основе сополимеров поли(3-гидроксибутирата) с 3-гидроксивалератом [П(3ГБ-со-3ГВ)] или 4-гидроксибутиратом [П(3ГБ-со-4ГБ)] являются эффективной матрицей для

доставки антибиотиков. Размер зон отсутствия роста бактерий *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus* зависел не от типа материала, а от чувствительности бактерий к антимикробным препаратам. Плёнки, содержащие 1% дорипенема или цефтазидима проявляли высокую эффективность в отношении *E. coli*; зоны отсутствия роста превышали 30 мм. В отношении *S. aureus* высокую эффективность показали плёнки, содержащие 1% дорипенема или 10% цефтазидима.

Действие хлоргексидина было средним независимо от типа материала и вида бактерий. Стрептоцид в обеих плёнках не оказал антимикробного действия на *S. aureus*, но показал среднюю активность в отношении *E. coli*.

5. Для нетканого материала эффективные концентрации антибиотиков для обоих видов бактерий составили 10%.

Список использованных источников

1. Крутяков Ю. А. и др. Синтез и свойства наночастиц серебра: достижения и перспективы //Успехи химии. – 2008. – Т. 77. – №. 3. – С. 242-269.
2. Яманова Р. Р., Николаенко Г. Р. О применении наночастиц серебра в легкой промышленности //Вестник Казанского технологического университета. – 2013. – Т. 16. – №. 22.
3. Волова Т. Г., Шишацкая Е. И., Миронов П. В. Материалы для медицины, клеточной и тканевой инженерии. – 2009.
4. Shaikh S. et al. Mechanistic insights into the antimicrobial actions of metallic nanoparticles and their implications for multidrug resistance //International journal of molecular sciences. – 2019. – Т. 20. – №. 10. – С. 2468.
5. Godoy-Gallardo M. et al. Antibacterial approaches in tissue engineering using metal ions and nanoparticles: From mechanisms to applications //Bioactive Materials. – 2021. – Т. 6. – №. 12. – С. 4470-4490.
6. Sukhanova A. et al. Dependence of nanoparticle toxicity on their physical and chemical properties //Nanoscale research letters. – 2018. – Т. 13. – №. 1. – С. 1-21.
7. Yang K. et al. Antimicrobial hydrogels: promising materials for medical application //International journal of nanomedicine. – 2018. – Т. 13. – С. 2217.
8. Букина Ю. А., Сергеева Е. А. Антибактериальные свойства и механизм бактерицидного действия наночастиц и ионов серебра //Вестник Казанского технологического университета. – 2012. – Т. 15. – №. 14.
9. Игнатов И. Н. И., Мосин О. В. Методы получения мелкодисперстных наночастиц коллоидного серебра //Вестник евразийской науки. – 2014. – №. 3.
10. Щербаков А. Б. и др. Препараты серебра: вчера, сегодня и завтра //Фармацевтический журнал. – 2006. – Т. 5. – С. 45-57.

11. Ge L. et al. Nanosilver particles in medical applications: synthesis, performance, and toxicity //International journal of nanomedicine. – 2014. – T. 9. – C. 2399.
12. Asanithi P., Chaiyakun S., Limsuwan P. Growth of silver nanoparticles by DC magnetron sputtering //Journal of Nanomaterials. – 2012. – T. 2012.
13. Haggag E. G. et al. Antiviral potential of green synthesized silver nanoparticles of *Lampranthus coccineus* and *Malephora lutea* //International journal of nanomedicine. – 2019. – T. 14. – C. 6217.
14. Khan S. U. et al. Nanosilver: new ageless and versatile biomedical therapeutic scaffold //International journal of nanomedicine. – 2018. – T. 13. – C. 733.
15. Zhang Q. et al. A systematic study of the synthesis of silver nanoplates: is citrate a “magic” reagent? //Journal of the American Chemical Society. – 2011. – T. 133. – №. 46. – C. 18931-18939.
16. Roldán M., Pellegrini N., de Sanctis O. Electrochemical method for Ag-PEG nanoparticles synthesis //Journal of Nanoparticles. – 2013. – T. 2013.
17. Sotiriou G. A. et al. Nanosilver on nanostructured silica: Antibacterial activity and Ag surface area //Chemical Engineering Journal. – 2011. – T. 170. – №. 2-3. – C. 547-554.
18. Ma H. et al. Synthesis of silver and gold nanoparticles by a novel electrochemical method //ChemPhysChem. – 2004. – T. 5. – №. 1. – C. 68-75.
19. Zhang Y. et al. Synthesis of silver nanoparticles via electrochemical reduction on compact zeolite film modified electrodes //Chemical Communications. – 2002. – №. 23. – C. 2814-2815.
20. Cao X., Ye Y., Liu S. Gold nanoparticle-based signal amplification for biosensing //Analytical biochemistry. – 2011. – T. 417. – №. 1. – C. 1-16.
21. Ahmad Z. et al. Alginate nanoparticles as antituberculosis drug carriers: formulation development, pharmacokinetics and therapeutic potential

//Indian journal of chest diseases and allied sciences. – 2006. – T. 48. – №. 3. – C. 171.

22. Sre P. R. R. et al. Antibacterial and cytotoxic effect of biologically synthesized silver nanoparticles using aqueous root extract of *Erythrina indica* lam //Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. – 2015. – T. 135. – C. 1137-1144.

23. Manikandan R. et al. Biosynthesis of silver nanoparticles using ethanolic petals extract of *Rosa indica* and characterization of its antibacterial, anticancer and anti-inflammatory activities //Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. – 2015. – T. 138. – C. 120-129.

24. Iravani S. et al. Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods //Research in pharmaceutical sciences. – 2014. – T. 9. – №. 6. – C. 385.

25. Ge L. et al. Nanosilver particles in medical applications: synthesis, performance, and toxicity //International journal of nanomedicine. – 2014. – T. 9. – C. 2399.

26. Kruis F. E., Fissan H., Rellinghaus B. Sintering and evaporation characteristics of gas-phase synthesis of size-selected PbS nanoparticles //Materials Science and Engineering: B. – 2000. – T. 69. – C. 329-334.

27. Mishra S. et al. Potential of biosynthesized silver nanoparticles using *Stenotrophomonas* sp. BHU-S7 (MTCC 5978) for management of soil-borne and foliar phytopathogens //Scientific reports. – 2017. – T. 7. – C. 45154.

28. Xue B. et al. Biosynthesis of silver nanoparticles by the fungus *Arthroderma fulvum* and its antifungal activity against genera of *Candida*, *Aspergillus* and *Fusarium* //International journal of nanomedicine. – 2016. – T. 11. – C. 1899.

29. Wei L. et al. Silver nanoparticles: synthesis, properties, and therapeutic applications //Drug discovery today. – 2015. – T. 20. – №. 5. – C. 595-601.

30. Elumalai E. K. et al. Extracellular synthesis of silver nanoparticles using leaves of *Euphorbia hirta* and their antibacterial activities // *J Pharm Sci Res.* – 2010. – T. 2. – №. 9. – C. 549-554.
31. Krishnaraj C. et al. Synthesis of silver nanoparticles using *Acalypha indica* leaf extracts and its antibacterial activity against water borne pathogens // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* – 2010. – T. 76. – №. 1. – C. 50-56.
32. Veerasamy R. et al. Biosynthesis of silver nanoparticles using mangosteen leaf extract and evaluation of their antimicrobial activities // *Journal of Saudi Chemical Society.* – 2011. – T. 15. – №. 2. – C. 113-120.
33. Chandran S. P. et al. Synthesis of gold nanotriangles and silver nanoparticles using *Aloevera* plant extract // *Biotechnology Progress.* – 2006. – T. 22. – №. 2. – C. 577-583.
34. Li S. et al. Green synthesis of silver nanoparticles using *Capsicum annum* L. extract // *Green Chemistry.* – 2007. – T. 9. – №. 8. – C. 852-858.
35. Jain D. et al. Synthesis of plant-mediated silver nanoparticles using papaya fruit extract and evaluation of their anti microbial activities // *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures.* – 2009. – T. 4. – №. 3. – C. 557-563.
36. Parikh R. Y. et al. Genus-wide physicochemical evidence of extracellular crystalline silver nanoparticles biosynthesis by *Morganella* spp // *PLoS One.* – 2011. – T. 6. – №. 6. – C. e21401.
37. Brayner R. et al. Cyanobacteria as bioreactors for the synthesis of Au, Ag, Pd, and Pt nanoparticles via an enzyme-mediated route // *Journal of Nanoscience and Nanotechnology.* – 2007. – T. 7. – №. 8. – C. 2696-2708.
38. Rajeshkumar S. et al. Intracellular and extracellular biosynthesis of silver nanoparticles by using marine bacteria *Vibrio alginolyticus* // *Nanosci Nanotechnol.* – 2013. – T. 3. – №. 1. – C. 21-25.
39. Mouxing F. U. et al. Rapid preparation process of silver nanoparticles by bioreduction and their characterizations // *Chinese Journal of Chemical Engineering.* – 2006. – T. 14. – №. 1. – C. 114-117.

40. Lengke M. F., Fleet M. E., Southam G. Biosynthesis of silver nanoparticles by filamentous cyanobacteria from a silver (I) nitrate complex //Langmuir. – 2007. – Т. 23. – №. 5. – С. 2694-2699.
41. Nair B., Pradeep T. Coalescence of nanoclusters and formation of submicron crystallites assisted by Lactobacillus strains //Crystal growth & design. – 2002. – Т. 2. – №. 4. – С. 293-298.
42. Ammar H. A. M., El- Desouky T. A. Green synthesis of nanosilver particles by Aspergillus terreus HA 1N and Penicillium expansum HA 2N and its antifungal activity against mycotoxigenic fungi //Journal of Applied Microbiology. – 2016. – Т. 121. – №. 1. – С. 89-100.
43. Sanghi R., Verma P. Biomimetic synthesis and characterisation of protein capped silver nanoparticles //Bioresource technology. – 2009. – Т. 100. – №. 1. – С. 501-504.
44. Sintubin L., Verstraete W., Boon N. Biologically produced nanosilver: current state and future perspectives //Biotechnology and Bioengineering. – 2012. – Т. 109. – №. 10. – С. 2422-2436.
45. Букина Ю. А., Сергеева Е. А. Антибактериальные свойства и механизм бактерицидного действия наночастиц и ионов серебра //Вестник Казанского технологического университета. – 2012. – Т. 15. – №. 14.
46. Rajeshkumar S. et al. Anticancer and enhanced antimicrobial activity of biosynthesized silver nanoparticles against clinical pathogens //Journal of molecular structure. – 2016. – Т. 1116. – С. 165-173.
47. Pazos-Ortiz E. et al. Dose-dependent antimicrobial activity of silver nanoparticles on polycaprolactone fibers against gram-positive and gram-negative bacteria //Journal of Nanomaterials. – 2017. – Т. 2017.
48. Gurunathan S. et al. Enhanced antibacterial and anti-biofilm activities of silver nanoparticles against Gram-negative and Gram-positive bacteria //Nanoscale research letters. – 2014. – Т. 9. – №. 1. – С. 1-17.
49. Elangovan K. et al. Phyto mediated biogenic synthesis of silver nanoparticles using leaf extract of Andrographis echinoides and its bio-efficacy on

anticancer and antibacterial activities //Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. – 2015. – Т. 151. – С. 118-124.

50. Станишевская И. Е. и др. Наночастицы серебра: получение и применение в медицинских целях //Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2016. – №. 1. – С. 66-69.

51. Rai M. K. et al. Silver nanoparticles: the powerful nanoweapon against multidrug- resistant bacteria //Journal of applied microbiology. – 2012. – Т. 112. – №. 5. – С. 841-852.

52. Уотерс У.Химия свободных радикалов//Москва : Государственное издательство иностранной литературы. – 1948.

53. Ма С., Чжэн К., Чэнь И. Свойства, применения и методы получения наносеребра //Международный студенческий научный вестник. – 2018. – №. 6. – С. 180-180.

54. Chen Z. et al. Aerobic condition enhances bacteriostatic effects of silver nanoparticles in aquatic environment: an antimicrobial study on *Pseudomonas aeruginosa* //Scientific Reports. – 2017. – Т. 7. – №. 1. – С. 1-8.

55. Kim K. J. et al. Antifungal effect of silver nanoparticles on dermatophytes //J Microbiol Biotechnol. – 2008. – Т. 18. – №. 8. – С. 1482-1484.

56. Velluti F. et al. Synthesis, characterization, microbiological evaluation, genotoxicity and synergism tests of new nano silver complexes with sulfamoxole: X-ray diffraction of $[Ag_2 (SMX)_2] \cdot DMSO$ //Journal of inorganic biochemistry. – 2014. – Т. 141. – С. 58-69.

57. Gajbhiye M. et al. Fungus-mediated synthesis of silver nanoparticles and their activity against pathogenic fungi in combination with fluconazole //Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine. – 2009. – Т. 5. – №. 4. – С. 382-386.

58. Jo Y. K., Kim B. H., Jung G. Antifungal activity of silver ions and nanoparticles on phytopathogenic fungi //Plant disease. – 2009. – Т. 93. – №. 10. – С. 1037-1043.

59. Ogar A., Tytko G., Turnau K. Antifungal properties of silver nanoparticles against indoor mould growth //Science of the Total Environment. – 2015. – T. 521. – C. 305-314.
60. Murray H. W. Susceptibility of Leishmania to oxygen intermediates and killing by normal macrophages //The Journal of experimental medicine. – 1981. – T. 153. – №. 5. – C. 1302-1315.
61. Khaydarov R. R. et al. Using silver nanoparticles as an antimicrobial agent //Biodefence. – Springer, Dordrecht, 2011. – C. 169-177.
62. Liu J. H. et al. Synergistic effect in an Au– Ag alloy nanocatalyst: CO oxidation //The Journal of Physical Chemistry B. – 2005. – T. 109. – №. 1. – C. 40-43.
63. Ameen K. B., Rajasekar K., Rajasekharan T. Silver nanoparticles in mesoporous aerogel exhibiting selective catalytic oxidation of benzene in CO₂ free air //Catalysis letters. – 2007. – T. 119. – №. 3-4. – C. 289-295.
64. Dharmadhikari D. V. et al. Precursor-dependent structural properties and antibacterial activity of copper oxide //Bulletin of Materials Science. – 2018. – T. 41. – C. 1-12.
65. V Singh A. et al. Biological synthesis of copper oxide nano particles using Escherichia coli //Current Nanoscience. – 2010. – T. 6. – №. 4. – C. 365-369.
66. Akintelu S. A. et al. Green synthesis of copper oxide nanoparticles for biomedical application and environmental remediation //Heliyon. – 2020. – T. 6. – №. 7. – C. e04508.
67. Sutradhar P., Saha M., Maiti D. Microwave synthesis of copper oxide nanoparticles using tea leaf and coffee powder extracts and its antibacterial activity //Journal of Nanostructure in Chemistry. – 2014. – T. 4. – C. 1-6.
68. Carnes C. L. et al. Synthesis, characterization, and adsorption studies of nanocrystalline copper oxide and nickel oxide //Langmuir. – 2002. – T. 18. – №. 4. – C. 1352-1359.

69. Chakraborty N. et al. Green synthesis of copper/copper oxide nanoparticles and their applications: a review //Green Chemistry Letters and Reviews. – 2022. – Т. 15. – №. 1. – С. 187-215.
70. Grigore M. E. et al. Methods of synthesis, properties and biomedical applications of CuO nanoparticles //Pharmaceuticals. – 2016. – Т. 9. – №. 4. – С. 75.
71. Waris A. et al. A comprehensive review of green synthesis of copper oxide nanoparticles and their diverse biomedical applications //Inorganic Chemistry Communications. – 2021. – Т. 123. – С. 108369.
72. Yedurkar S. M., Maurya C. B., Mahanwar P. A. A biological approach for the synthesis of copper oxide nanoparticles by Ixora coccinea leaf extract //J. Mater. Environ. Sci. – 2017. – Т. 8. – №. 4. – С. 1173-1178.
73. Vijaya Kumar R. et al. Sonochemical preparation and characterization of nanocrystalline copper oxide embedded in poly (vinyl alcohol) and its effect on crystal growth of copper oxide //Langmuir. – 2001. – Т. 17. – №. 5. – С. 1406-1410.
74. Yin A. J. et al. Fabrication of highly ordered metallic nanowire arrays by electrodeposition //Applied Physics Letters. – 2001. – Т. 79. – №. 7. – С. 1039-1041.
75. Wang H. et al. Preparation of CuO nanoparticles by microwave irradiation //Journal of crystal growth. – 2002. – Т. 244. – №. 1. – С. 88-94.
76. Xu J. F. et al. Preparation and characterization of CuO nanocrystals //Journal of Solid State Chemistry. – 1999. – Т. 147. – №. 2. – С. 516-519.
77. Ульянкина А.А., Смирнова Н.В. О механизме электрохимического образования нанодисперсных оксидов меди под действием переменного импульсного тока // Фундаментальные исследования. – 2017. – № 12-1. – С. 126-131.
78. Zhang Q. et al. CuO nanostructures: synthesis, characterization, growth mechanisms, fundamental properties, and applications //Progress in Materials Science. – 2014. – Т. 60. – С. 208-337.

79. Jadhav S. et al. Copper oxide nanoparticles: synthesis, characterization and their antibacterial activity //Journal of cluster science. – 2011. – Т. 22. – С. 121-129.
80. Suleiman M. et al. Copper (II)-oxide nanostructures: synthesis, characterizations and their applications-review //Journal of Materials and Environmental Science. – 2013. – Т. 4. – №. 5. – С. 792-797.
81. Yedurkar S. M., Maurya C. B., Mahanwar P. A. A biological approach for the synthesis of copper oxide nanoparticles by *Ixora coccinea* leaf extract //J. Mater. Environ. Sci. – 2017. – Т. 8. – №. 4. – С. 1173-1178.
82. Castillo-Duran C., Uauy R. Copper deficiency impairs growth of infants recovering from malnutrition //The American journal of clinical nutrition. – 1988. – Т. 47. – №. 4. – С. 710-714.
83. Rydosz A. The use of copper oxide thin films in gas-sensing applications //Coatings. – 2018. – Т. 8. – №. 12. – С. 425
84. Makarov V. V. et al. “Green” nanotechnologies: synthesis of metal nanoparticles using plants //Acta Naturae (англоязычная версия). – 2014. – Т. 6. – №. 1 (20). – С. 35-44.
85. Ahmed S. et al. A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: a green expertise //Journal of advanced research. – 2016. – Т. 7. – №. 1. – С. 17-28.
86. Sarkar J. et al. Green synthesized copper oxide nanoparticles ameliorate defence and antioxidant enzymes in *Lens culinaris* //Nanomaterials. – 2020. – Т. 10. – №. 2. – С. 312.
87. Kumar P. P. N. V. et al. Green synthesis of copper oxide nanoparticles using *Aloe vera* leaf extract and its antibacterial activity against fish bacterial pathogens //BioNanoScience. – 2015. – Т. 5. – С. 135-139.
88. Bordbar M., Sharifi-Zarchi Z., Khodadadi B. Green synthesis of copper oxide nanoparticles/clinoptilolite using *Rheum palmatum* L. root extract: high catalytic activity for reduction of 4-nitro phenol, rhodamine B, and methylene blue //Journal of sol-Gel science and Technology. – 2017. – Т. 81. – С. 724-733.

89. Narayanan K. B., Sakthivel N. Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes //Advances in colloid and interface science. – 2010. – T. 156. – №. 1-2. – C. 1-13.
90. Gupta S., Bector S. Biosynthesis of extracellular and intracellular gold nanoparticles by *Aspergillus fumigatus* and *A. flavus* //Antonie Van Leeuwenhoek. – 2013. – T. 103. – C. 1113-1123.
91. Mukherjee P. et al. Bioreduction of AuCl_4^- ions by the fungus, *Verticillium* sp. and surface trapping of the gold nanoparticles formed //Angewandte Chemie International Edition. – 2001. – T. 40. – №. 19. – C. 3585-3588.
92. Consolo V. F., Torres-Nicolini A., Alvarez V. A. Mycosynthetized Ag, CuO and ZnO nanoparticles from a promising *Trichoderma harzianum* strain and their antifungal potential against important phytopathogens //Scientific Reports. – 2020. – T. 10. – №. 1. – C. 1-9.
93. Kasana R. C. et al. Biosynthesis and effects of copper nanoparticles on plants //Environmental Chemistry Letters. – 2017. – T. 15. – C. 233-240.
94. Applerot G. et al. Understanding the antibacterial mechanism of CuO nanoparticles: revealing the route of induced oxidative stress //Small. – 2012. – T. 8. – №. 21. – C. 3326-3337.
95. Camacho-Flores B. A. et al. Copper: synthesis techniques in nanoscale and powerful application as an antimicrobial agent //Journal of Nanomaterials. – 2015. – T. 16. – №. 1. – C. 423-423.
96. Naika H. R. et al. Green synthesis of CuO nanoparticles using *Gloriosa superba* L. extract and their antibacterial activity //Journal of Taibah University for Science. – 2015. – T. 9. – №. 1. – C. 7-12.
97. Sathiyavimal S. et al. Biogenesis of copper oxide nanoparticles (CuONPs) using *Sida acuta* and their incorporation over cotton fabrics to prevent the pathogenicity of Gram negative and Gram positive bacteria //Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. – 2018. – T. 188. – C. 126-134.

98. Ungur G., Hruza J. Influence of copper oxide on the formation of polyurethane nanofibers via electrospinning //Fibers and Polymers. – 2015. – T. 16. – C. 621-628.
99. Das D. et al. Synthesis and evaluation of antioxidant and antibacterial behavior of CuO nanoparticles //Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. – 2013. – T. 101. – C. 430-433.
100. Goyal R. et al. Nanoparticles and nanofibers for topical drug delivery //Journal of Controlled Release. – 2016. – T. 240. – C. 77-92.
101. El-Nahhal I. M. et al. Nanostructured copper oxide-cotton fibers: synthesis, characterization, and applications //International nano letters. – 2012. – T. 2. – C. 1-5.
102. Devi A. B. et al. Novel synthesis and characterization of CuO nanomaterials: Biological applications //Chinese Chemical Letters. – 2014. – T. 25. – №. 12. – C. 1615-1619.
103. Rajesh K. M. et al. Assisted green synthesis of copper nanoparticles using *Syzygium aromaticum* bud extract: Physical, optical and antimicrobial properties //Optik. – 2018. – T. 154. – C. 593-600.
104. El-Batal A. I. et al. *Penicillium chrysogenum*-mediated mycogenic synthesis of copper oxide nanoparticles using gamma rays for in vitro antimicrobial activity against some plant pathogens //Journal of Cluster Science. – 2020. – T. 31. – C. 79-90.
105. Saharan V. et al. Synthesis and in vitro antifungal efficacy of Cu-chitosan nanoparticles against pathogenic fungi of tomato //International journal of biological macromolecules. – 2015. – T. 75. – C. 346-353.
106. Ramyadevi J. et al. Copper nanoparticles synthesized by polyol process used to control hematophagous parasites //Parasitology research. – 2011. – T. 109. – C. 1403-1415.
107. Kanhed P. et al. In vitro antifungal efficacy of copper nanoparticles against selected crop pathogenic fungi //Materials Letters. – 2014. – T. 115. – C. 13-17.

108. Harishchandra B. D. et al. Copper nanoparticles: a review on synthesis, characterization and applications //Asian Pacific Journal of Cancer Biology. – 2020. – Т. 5. – №. 4. – С. 201-210.
109. Prakash P. et al. Advances in polyhydroxyalkanoate nanocarriers for effective drug delivery: an overview and challenges //Nanomaterials. – 2022. – Т. 12. – №. 1. – С. 175.
110. Murueva A. V. et al. Development and characterization of ceftriaxone-loaded P3HB-based microparticles for drug delivery //Drying Technology. – 2019. – Т. 37. – №. 9. – С. 1131-1142.
111. Vorobyev S. A. et al. The Influence of the Reaction Conditions on the Size of Silver Nanoparticles in Carey Lea's Concentrated Sols //Journal of Siberian Federal University. Chemistry. – 2020. – Т. 13. – №. 3. – С. 372-384.
112. Карпов Д. В. и др. Синтез и изучение физико-химических свойств плотных зольей анизотропных наночастиц сфо //Химическая наука и образование Красноярья. – 2022. – С. 37-41.
113. Vidal. Справочник лекарственных средств. Стрептоцид [Электронный ресурс] Режим доступа: https://www.vidal.ru/drugs/streptocide_44161 (Дата обращения: 18.06.2023)
114. Vidal. Справочник лекарственных средств. Дорипенем [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://www.vidal.ru/drugs/doripenem> (Дата обращения: 18.06.2023)
115. Vidal. Справочник лекарственных средств. Цефтазидим [Электронный ресурс] Режим доступа: https://www.vidal.ru/drugs/ceftazidim_9317 (Дата обращения: 18.06.2023)
116. Vidal. Справочник лекарственных средств. Хлоргексидин [Электронный ресурс] Режим доступа: https://www.vidal.ru/drugs/chlorhexidine_21450 (Дата обращения: 18.06.2023)
117. Кулешова С. И. Определение активности антибиотиков методом диффузии в агар //Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. – 2015. – №. 3. – С. 13-17.

118. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: Методические указания.—М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004.— 91 с.


ПРИЛОЖЕНИЕ А

Страницы 67-71 изъятые в связи с авторским правом

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

 Т. Г. Волова

«26» июня 2023 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

06.04.01 Биология

Антимикробные свойства наночастиц металлов и композитных материалов
на основе полигидроксиалканоатов и антибиотиков

Руководитель


подпись, дата

д.б.н., профессор
должность, ученая степень


С. В. Прудникова
инициалы, фамилия

Выпускник


подпись, дата

Е. В. Василенко
инициалы, фамилия

Рецензент

 22.06.2023
подпись, дата

с.н.с., к.б.н.
должность, ученая степень

Г. И. Антонов
инициалы, фамилия

Красноярск 2023