

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации  
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего  
образования  
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ  
«МИСИС»  
(НИТУ «МИСИС»)

На правах рукописи

Котякова(Гудзь) Кристина Юрьевна

РАЗРАБОТКА ГИБРИДНЫХ НАНОМАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ  
ГЕКСАГОНАЛЬНОГО НИТРИДА БОРА С ВЫСОКОЙ БАКТЕРИЦИДНОЙ И  
ФУНГИЦИДНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

2.6.5 – Порошковая металлургия и композиционные материалы

Диссертация на соискание ученой степени кандидата технических наук

Научный руководитель:  
доктор физико-математических наук,  
профессор кафедры ПМиФП Штанский Д.В.

Москва 2022

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. Аналитический обзор литературы	
1.1 Материалы для создания бактерицидных поверхностей	11
1.1.1 Стратегии разработки антибактериальных покрытий	11
1.1.1.1 Стратегия механического повреждения патогенов	11
1.1.1.2 Антиадгезионные стратегии	12
1.1.1.3 Стратегия высвобождения	12
1.1.2 Материалы для разработки бактерицидных наночастиц	18
1.1.2.1 Механизмы бактерицидного действия наночастиц	20
1.1.2.2 Модификация поверхности наночастиц	22
1.2 2D-материалы в биоинженерии	27
1.3 Постановка задачи исследования	29
ГЛАВА 2. Методы получения и исследования свойств материалов	
2.1 Синтез покрытий на основе <i>h</i> -BN	31
2.2 Газо-фазовый синтез наночастиц на основе <i>h</i> -BN	32
2.3 Осаждение Ag на поверхность наночастиц <i>h</i> -BN	33
2.4 Осаждение частиц переходных металлов на покрытия <i>h</i> -BN	33
2.5 Пришивка антибиотиков на поверхность покрытий <i>h</i> -BN	33
2.6 Функционализация поверхности наночастиц <i>h</i> -BN антибиотиками	34
2.7 Изучение структуры и химического состава поверхностей	35
2.8 Методика изучения смачиваемости поверхности покрытий	35
2.9 Методика изучения выхода антибиотиков в буферные растворы	36
2.10 Методика изучения выхода ионов металлов в физиологический раствор	37
2.11 Методика измерения количества АФК	37
2.12 Методика изучения контактного-взаимодействия материалов с бактериями	37
ГЛАВА 3. Разработка антибактериальных покрытий в системе <i>h</i> -BN/ <i>Me</i> /антибиотики	
3.1 Получение наноструктурированных покрытий <i>h</i> -BN	39
3.1.1 Анализ покрытий методами СЭМ, ПЭМ	39
3.1.2 Исследование поверхности покрытий методами ИК-Фурье спектроскопии, РФЭС	41
3.2 Получение покрытий <i>h</i> -BN/ <i>Me</i>	42
3.2.1 Исследование покрытий методами ПЭМ, РФЭС	42
3.2.2 Изучение выхода бактерицидных ионов	48

3.2.3	Исследование влияния осаждения частиц <i>Me</i> на смачиваемость покрытий	49
3.3	Получение покрытий <i>h</i> -BN/антибиотики	51
3.3.1	Исследование поверхности методами РФЭС, ИК-Фурье спектроскопии	51
3.3.2	Изучение выхода антибиотиков	55
3.3.3	Исследование влияния пришивки антибиотиков на смачиваемость покрытий	57
ГЛАВА 4. Разработка наночастиц в системе <i>h</i> -BN/ <i>Me</i> /антибиотики		
4.1	Синтез и анализ наночастиц на основе <i>h</i> -BN	58
4.2	Получение и анализ наночастиц <i>h</i> -BN/ <i>Me</i>	60
4.2.1	Исследование поверхности наночастиц методами СЭМ, ПЭМ, ИК-Фурье спектроскопии и РФА	60
4.2.2	Изучение стабильности и выхода бактерицидных ионов	61
4.3	Получение наночастиц <i>h</i> -BN/антибиотики	62
4.3.1	Исследование влияния пришивки антибиотиков на размер и дзета потенциала наночастиц	62
4.3.2	Исследование поверхности наночастиц методами РФЭС, ИК-Фурье спектроскопии	64
4.3.3	Изучение стабильности и выхода антибиотиков	67
4.4	Получение гибридных наночастиц <i>h</i> -BN/ <i>Me</i> /антибиотики	68
4.4.1	Исследование влияния пришивки антибиотиков на размер и дзета потенциала наночастиц	68
4.4.2	Исследование наногбридов методами РФЭС, ИК-Фурье спектроскопии	69
4.4.3	Изучение стабильности и выхода бактерицидных ионов	72
4.4.4	Изучение выхода антибиотиков	73
ГЛАВА 5. Биологические испытания		
5.1	Исследование бактерицидных свойств покрытий	74
5.1.1	Методика оценки бактерицидной активности путем подсчета количества КОЕ	74
5.1.2	Методика оценки бактерицидной активности с помощью диффузионных тестов в агаре	74
5.1.3	Бактерицидные свойства покрытий <i>h</i> -BN и <i>h</i> -BN/антибиотики морфологии	75
5.1.4	Изучение контактного-взаимодействия материалов с бактериями	77
5.1.5	Исследование генерации АФК	79
5.1.6	Покрытия <i>h</i> -BN/ <i>Me</i>	81
5.1.6.1	Оценка бактерицидной активности путем подсчета количества КОЕ	81

5.1.6.2	Оценка бактерицидной активности с помощью тестов на диффузию в агар	84
5.1.6.3	Исследование генерации АФК	85
5.1.6.4	Сравнение результатов бактерицидного действия Ag и Fe	86
5.2	Исследование бактерицидных свойств наночастиц	89
5.2.1	Методика исследования бактерицидных свойств	89
5.2.2	Наночастицы на основе <i>h</i> -BN	90
5.2.3	Визуализация взаимодействия наночастиц с бактерией	97
5.3	Исследование фунгицидных свойств покрытий	99
5.3.1	Методика исследования фунгицидных свойств	99
5.3.2	Наноструктурированные покрытия на основе <i>h</i> -BN	100
5.4	Исследование фунгицидных свойств наночастиц	102
5.4.1	Методика исследования фунгицидных свойств	102
5.4.2	Наночастицы <i>h</i> -BN	102
	ВЫВОДЫ	104
	СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	107
	ПРИЛОЖЕНИЕ А. АКТЫ БИОЛОГИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЙ	132
	ПРИЛОЖЕНИЕ Б. СВИДЕТЕЛЬСТВО О РЕГИСТРАЦИИ НОУ-ХАУ	141

## ВВЕДЕНИЕ

С древних времен борьба человека с инфекцией была одной из главных медицинских задач. Известно, что серебро и медь использовались в качестве бактерицидных материалов с древних времен, в основном, для обеззараживания воды, других известных бактерицидных материалов в природе не существовало. В последние годы из-за значительного увеличения количества операций в ортопедической и стоматологической хирургии во всем мире микробные инфекции стали еще более серьезной проблемой. Медикаментозная терапия (перорально или в виде инъекций) часто приводит к неблагоприятным побочным эффектам из-за невозможности локализации препарата в организме и необходимости применения высокой дозы. Разработка и применение материалов локального терапевтического воздействия с низкой дозой бактерицидного агента по сравнению с традиционными методами лекарственной терапии является многообещающим способом решения данной проблемы.

Помимо традиционной терапии антибиотиками, в настоящее время разработаны различные методы борьбы с инфекциями путем нанесения антибактериальных покрытий или локальной доставки наночастиц с бактерицидными агентами. Среди различных стратегий борьбы с бактериальными и грибковыми инфекциями наибольшее внимание уделяется введению бактерицидных компонентов (антибиотики, пептиды, металлические частицы), контролируемому выходу бактерицидных ионов и генерированию активных форм кислорода. Эти подходы, однако, требуют тщательной оптимизации бактерицидного компонента, чтобы избежать токсичности материала. Например, ионы тяжелых металлов токсичны и признаны серьезной проблемой для здоровья человека. Контролируемое высвобождение ионов труднодостижимо из-за многих факторов, таких как содержание бактерицидного элемента, степень его агломерации, топография и кинетика окисления поверхности. Все эти факторы влияют на высвобождение бактерицидных ионов. Основное преимущество стратегии насыщения поверхности антибиотиками, заключается в том, что они быстро подавляют инфекцию, всего в течение нескольких часов, даже при относительно низкой концентрации. Однако использование антибиотиков в высокой дозировке приводит к появлению все большего числа устойчивых к антибиотикам бактерий. Было бы ошибочным полагать, что использование только одного терапевтического компонента или задействование только одного механизма клеточной гибели может обеспечить широкую защиту от различных бактериальных и грибковых инфекций. Анализ современного состояния исследований показывает, что подход, основанный на сочетании двух или более терапевтических компонентов, является

наиболее успешным. Эта стратегия направлена либо на распространение антибактериального и противогрибкового действия на большее количество патогенов, либо на достижение синергетического эффекта.

Основой для создания новых материалов был выбран гексагональный нитрид бора. Благодаря своим уникальным физико-химическим и механическим свойствам наноструктуры из *h*-BN вызывают все больший интерес для биоинженерии. Антибактериальный эффект достигался за счет создания наноструктурированных поверхностей, способных механически повреждать мембрану бактерий, что приводило к их гибели. Для придания наноструктурам *h*-BN антибактериального эффекта их насыщали антибиотиками широкого спектра действия или высаживали на поверхность металлические наночастицы, способные генерировать активные формы кислорода. Преимуществом разработанных материалов является комбинация нескольких механизмов подавления инфекций: механическое повреждение мембранной стенки бактерий, выщелачивание антибактериальных агентов (антибиотики, ионы металлов) и генерация активных форм кислорода. Благодаря этим подходам удалось достичь антибактериального эффекта, используя минимальные ингибирующие концентрации антибактериальных агентов.

### **Актуальность работы**

Актуальность работы заключается в большой потребности в новых высокоэффективных материалах, сочетающих различные механизмы антибактериального эффекта и не оказывающих пагубного воздействия на организм. Это позволит снизить риск возникновения послеоперационных инфекций и развития резистивности бактерий к антибиотикам. Актуальность работы подтверждена ее реализацией в рамках нескольких проектов:

1. Программа повышения конкурентоспособности НИТУ «МИСиС» среди ведущих мировых научно-образовательных центров исследований для поддержки аспирантов, приглашенных для проведения совместных научных исследований в области развития научного направления в течение 2-х лет (2018 – 2020 гг.) на выполнение научно-исследовательской работы № К2А-2018-038 Договор о гранте аспиранта № В100-А38-2018/0110 от 03.09.2018 г. теме: "Разработка биосовместимых покрытий и гибридных наноматериалов на основе гексагонального нитрида бора для борьбы с инфекциями и онкологическими патологиями".

2. Грант Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ) № 20-33-90040\20 от 24.08.2021 г. в рамках конкурса «на лучшие проекты фундаментальных

научных исследований, выполняемые молодыми учеными, обучающимися в аспирантуре» по теме: "Разработка умной платформы на основе гексагонального нитрида бора для перспективных биологических сенсоров, фильтров и бактерицидных поверхностей.

3. Программа повышения конкурентоспособности НИТУ «МИСиС» среди ведущих мировых научно-образовательных центров исследований для проведения научного исследования на тему «Новые виды сплавов, наноматериалов и покрытий для улучшения качества жизни» грант № К2-2018-012.

4. Грант Российского Научного Фонда (РНФ) № 20-19-00120 по теме: «Разработка новых бактерицидных поверхностей на основе изучения основных механизмов подавления возбудителей бактериальной и грибковой инфекции»

### **Цель диссертационной работы**

Получение наночастиц и покрытий на основе гексагонального нитрида бора ( $h$ -BN), обладающих выраженной бактерицидной и фунгицидной активностью за счет комбинации различных механизмов подавления патогенов: механического повреждения, воздействия бактерицидных ионов и терапевтических агентов, генерации активных форм кислорода (АФК).

Для достижения поставленной цели, в работе решались следующие задачи:

- получение наноструктурированных покрытий и полых наночастиц  $h$ -BN методом химического осаждения из газовой фазы;
- насыщение и присоединение к поверхности полученных наноструктур антибиотиков широкого спектра действия (гентамицина и амфотерицин В), а также и их комбинаций, направленные на подавление бактериальной и грибковой инфекции;
- формирование на поверхности наноструктур  $h$ -BN наночастиц металлов (Ag, Fe) и их оксидов методами термического и ультрафиолетового-разложения;
- изучение структуры, состава и морфологии полученных наноструктур методами просвечивающей и сканирующей электронной микроскопии, инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье, рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии;
- выявление зависимости дзета потенциала и размера наночастиц  $h$ -BN от концентрации загруженного антибиотика;
- определение кинетики выхода бактерицидных компонентов с поверхности гибридных наноструктур на основе  $h$ -BN;

- изучение генерации активных форм кислорода гибридными наноструктурами *h*-BN;
- определение краевого угла смачивания покрытий на основе *h*-BN;
- изучение механического повреждения бактерий наноструктурами *h*-BN методом просвечивающей электронной микроскопии;
- проведение биологических испытаний с целью определения бактерицидной и фунгицидной активности полученных гибридных наноматериалов на основе *h*-BN в отношении широкого спектра бактериальных и грибковых штаммов;
- выявление механизмов подавления бактериальной и грибковой инфекции применительно к различным наноматериалам на основе *h*-BN.

### **Научная новизна**

1. С помощью *in-situ* исследований в просвечивающем электронном микроскопе показана возможность механического повреждения наноструктурами покрытия из гексагонального нитрида бора стенки бактерии кишечной палочки K-261, приводящего к ее гибели.
2. На основе измерения дзета потенциала и размера наночастиц *h*-BN и *h*-BN/Ag, а также значений минимальной ингибиторной концентрации антибиотиков, определены оптимальные концентрации загружаемого в наночастицы гентамицина и амфотерицина В, обеспечивающие сильный бактерицидный и фунгицидный эффекты.
3. Установлены кинетические закономерности выхода металлических ионов (Ag, Fe) и антибиотиков (гентамицин, амфотерицин В) с поверхности покрытий *h*-BN/Ag, *h*-BN/Fe, *h*-BN-G и *h*-BN-A в зависимости от концентрации наночастиц серебра и оксида железа на поверхности *h*-BN, а также содержания загруженного терапевтического компонента.
4. Найдены минимальные ингибиторные концентрации наночастиц серебра (25 мкг/см<sup>2</sup>) и оксида железа (74 мкг/см<sup>2</sup>) на поверхности покрытий *h*-BN, необходимые для эффективного подавления штаммов бактерий кишечной палочки, золотистого стафилококка, пневмококка и кандидозного паразитоза.
5. Получены гибридные полые наносферы *h*-BN, содержащие наночастицы Ag, антибиотики и противогрибковые средства, обладающие широким спектром антибактериального и фунгицидного действия за счет комбинированного воздействия бактерицидных ионов и терапевтических средств.

## **Практическая значимость**

1. Разработан способ получения наноструктурированных покрытий из гексагонального нитрида бора с антибактериальным эффектом, зарегистрированный в виде ноу-хау в депозитарии НИТУ «МИСиС» № 08-457-2022 ОИС от 29 апреля 2022 года.

2. Определены минимальные ингибирующие концентрации антибиотиков (гентамицина, ципрофлоксацина, амфотерицина В) в наноструктурах *h*-BN для подавления широкого спектра бактериальных и грибковых штаммов.

3. В Федеральном бюджетном учреждении наук «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» проведены биологические испытания исходных и поверхностно-модифицированных покрытий и наночастиц на основе *h*-BN, которые продемонстрировали высокие антибактериальные и фунгицидные свойства наноструктур, что позволило их рекомендовать в качестве перспективных материалов для борьбы с бактериальной и грибковой инфекциями.

## **Положения, выносимые на защиту**

1. Установленную зависимость размера и дзета потенциала наночастиц *h*-BN/Ag-Гентамицин и *h*-BN/Ag-Амфотерицин В от концентрации терапевтического компонента.

2. Установленные зависимости антибактериальной и фунгицидной активности от типа и концентрации терапевтических агентов, загруженных в наночастицы и покрытия *h*-BN.

3. Установленные зависимости антибактериальной и фунгицидной активности от типа и концентрации бактерицидных наночастиц на поверхности покрытий и наночастиц *h*-BN.

4. Установленный сильный антибактериальный эффект (>99%) покрытия *h*-BN в отношении антибиотик-резистентного штамма кишечной палочки К-261 (сопоставимый с образцом *h*-BN, загруженным гентамицином (150 мкг/см<sup>2</sup>)), который объясняется одновременным механическим повреждением бактерий и генерацией реактивных форм кислорода.

## **Апробация работы**

Основные положения и результаты работы были представлены на следующих конференциях: Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых

учёных «Ломоносов-2019», 8 - 12 Апреля 2019 г., Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова; XVI Российская ежегодная конференция молодых научных сотрудников и аспирантов «Физико-химия и технология неорганических материалов» (с международным участием), 1 - 4 октября 2019 г., Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова Российской академии наук; XVII Российская ежегодная конференция молодых научных сотрудников и аспирантов «Физико-химия и технология неорганических материалов» (с международным участием), 10 – 13 ноября 2020 г., Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова Российской академии наук; Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2021», 12 - 23 Апреля 2021 г., Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова; XVIII Российская ежегодная конференция молодых научных сотрудников и аспирантов «Физико-химия и технология неорганических материалов» (с международным участием), 30 ноября– 3 декабря 2021 г., Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова Российской академии наук; II Международная конференция "Физика Конденсированных Состояний-2021", посвященная 90 летию со дня рождения академика Ю. А. Осипьяна (1931-2008), 31 мая - 4 июня 2021 г., Черноголовка.

### **Публикации по теме диссертации**

По материалам диссертации имеется 10 публикаций, из них 3 публикации в журналах, индексируемых в базах данных Scopus и Web of science, 6 докладов на конференциях и 1 ноу- хау.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертационная работа состоит из введения, 5 глав, общих выводов, списка использованных источников и 3 приложений. Диссертация имеет объем 132 страниц, включая 16 таблицы, 51 рисунков, список использованных источников из 256 наименований.

## **ГЛАВА 1. Аналитический обзор литературы**

### **1.1 Материалы для создания бактерицидных поверхностей**

Разработка антибактериальных покрытий всегда являлась важной задачей в области биомедицинской инженерии, так как патогенные бактерии и вызываемые ими инфекции являются одной из основных причин отторжения имплантатов. Одним из наиболее эффективных способов решения данной проблемы является разработка многофункциональных наноструктур с высокой бактерицидной и фунгицидной активностью, минимизирующих риск бактериальной контаминации за счет локальной доставки бактерицидного компонента без ухудшения объемных характеристик материала [1].

#### **1.1.1 Стратегии разработки антибактериальных покрытий**

Благодаря последним достижениям в области биоинженерии поверхности появились возможности разработки многофункциональных покрытий одновременно удовлетворяющих множеству требований по стабильности в биологических средах, бактерицидным, механическим или химическим свойствам. В целом можно выделить три стратегии подавления бактерицидных и фунгицидных инфекций с помощью покрытий: механическое повреждение патогенов, антиадгезивные покрытия и высвобождение антибактериальных агентов [2–4].

##### **1.1.1.1 Стратегия механического повреждения патогенов**

Стратегия механического повреждения патогенов, была разработана для устранения проблемы израсходования бактерицидных агентов для материалов на основе высвобождения [5]. Основным механизмом подавления инфекций в данном подходе считается разрушение клеточной мембраны бактерии при физическом контакте с поверхностью покрытий [6]. Бактерицидная активность наноструктурированных поверхностей и их способность убивать бактерии за счет механического взаимодействия с клеточными стенками была продемонстрирована для различных наноматериалов, таких как черный кремний [7], углеродные наноструктуры [8-9], наностержни оксида цинка [10], нанолисты оксида меди. [11]. Сообщалось, что на способность поверхностей к контактному уничтожению влияют наноструктурные характеристики материала [12].

### **1.1.1.2 Антиадгезионные стратегии**

Покрытия, обладающие антиадгезионными свойствами, на ранних стадиях препятствуют образованию биопленок за счет использования нецитотоксических механизмов. Так, *in vitro* были продемонстрированы отличные антиадгезионные свойства покрытий с иммобилизованными на поверхности молекулами полиэтиленгликоля и цвиттериона, которые способны сопротивляться адсорбции белков [13]. И несмотря на проблемы со стабильностью, обычно применение данных молекул считается стандартным подходом для разработки антиадгезионных покрытий [14-16].

### **1.1.1.3 Стратегия высвобождения**

Стратегия высвобождения антибактериальных агентов осуществляется за счет выщелачивания антибактериальных агентов (антибиотики, металлы, пептиды) за счет диффузии или эрозии/разрушения [17], что позволяет бороться с бактериями в течение длительного времени. В сравнении с другими стратегиями подход высвобождения антибактериальных агентов обеспечивает бактерицидную и фунгицидную активность локально, тем самым сводя к минимуму воздействие на окружающую среду и организм в целом. Однако, стоит отметить, хоть иммобилизация антибиотиков на поверхности покрытий самая известная, но не единственная стратегия подавления бактериальной инфекции, так антибактериальные покрытия, модифицированные ионами бактерицидных металлов (Ag, Au, Fe, Cu и др.) все чаще использовались в исследованиях в последние годы. Бактерицидный эффект достигается путем высвобождения ионов, которые убивают бактерии через один или несколько известных механизмов, таких как повреждение бактериальной мембраны, блокирование АФК-синтезов, предотвращение клеточного дыхания [18]. Упомянулось так же, что, если материал покрытия содержит металлические наночастицы различных бактерицидных ионов, спектр его действия будет больше [19]. Ионы металлов обладают способностью вытеснять элементы, такие как Ca и Zn, содержащиеся в стенках бактерий, ингибируя их действие или убивая их [20].

За последние десятилетия был разработан широкий спектр покрытий на основе высвобождения. Самым первым и до сих пор наиболее распространенным методом осаждения антибактериальных агентов на поверхность покрытий, является метод пропитки, однако отсутствие прочного связывания с покрытием приводит к быстрому высвобождению [21]. В настоящее время системы доставки включают широкий спектр материалов-носителей и антибактериальных агентов. Механизмы подавления

бактерицидных инфекций различными антибактериальными агентами представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Механизмы подавления бактериальных инфекций различными агентами

Антибактериальный агент	Высвобождаемые соединения	Механизмы антибактериального действия	ссылка
Антибиотики	Гентамицина сульфат, тобрамицин	Ингибирование синтеза белка, что приводит к образованию АФК	22
	Ципрофлаксин	оказывает прямое бактерицидное действие на бактерии через SOS-ответ, который высвобождает большое количество АФК, вызывая повреждение ДНК и гибель бактерий	23
	Рифампицин	оказывает влияние на иммунный ответ при инфекции на нескольких уровнях	24
	Ампициллин	Нарушение синтеза клеточной стенки посредством ферментативного ингибирования.	25
	Ванкомицин	Нарушение синтеза клеточной стенки путем связывания с аминокислотами	26
	Миноциклин, тетрациклин	Ингибирование синтеза белка	27

Антибактериальный агент	Высвобождаемые соединения	Механизмы антибактериального действия	ссылка
	Рифампин	Ингибирование транскрипции ДНК путем связывания с РНК-полимеразой. Эффективен против грамположительных бактерий.	28
<p>Антибиотики нацелены на энергоемкие процессы. Однако не смотря на ряд преимуществ их использования, недостатком является потенциальный риск развития резистентности, что усложняет их применение</p>			
Антимикробные пептиды	Аламитицин	вызывает коллапс клеточной мембраны и приводит к гибели клеток при проникновении в верхние свои клеточной мембраны, образуя каналы по которым осуществляется цитоплазматический отток	29
	Кателицидин LL-37	покрывает поверхность клетки и разрушает клеточную мембрану путем ее растворения	30, 31
	Цекропин P1	покрывает поверхность клеточной мембраны патогена для дестабилизации и, в конечном итоге, разрушает ее	32

Антибактериальный агент	Высвобождаемые соединения	Механизмы антибактериального действия	ссылка
	APP	эффективно убивает <i>C. albicans</i> из-за его способности проникать в клетки, сильной ДНК-связывающей способности и способности индуцировать остановку S-фазы во внутриклеточной среде	33
	Нистанин 5	взаимодействует с митохондриями, вызывая продукцию ROS и вызывая гибель клеток	34
	TFP 1-1TC24	проникает в цитоплазму клеток-мишеней после разрыва клеточной мембраны, а затем разрушает ДНК и РНК	35
	DM3	влияет на многие важные внутриклеточные пути биосинтеза белка клеток	36

Антибактериальный агент	Высвобождаемые соединения	Механизмы антибактериального действия	ссылка
<p>Однако несмотря на многообещающие перспективы применения пептидов в борьбе против бактерицидных инфекций, необходимы дальнейшие исследования зарегистрированных пептидов, чтобы решить проблему взаимосвязи структуры и функции. Покрытия на основе пептидов должны развиваться по мере развития медицинской науки, но не фоне относительно низкого уровня успешности клинического применения в настоящее время.</p>			
Металлические частицы	Ag	<p>Полное описание способов действия остается нерешенным. Известно, что Ag дезактивирует ферменты путем связывания с тиоловыми группами и ингибирует дыхательную цепь. Способствует образованию АФК. Безусловно, наиболее часто используемый антибактериальный.</p>	37-39
	Cu	<p>Генерирование АФК. Вызывает перекисное окисление липидов в бактериальных мембранах. Большинство тяжелых металлов могут вызывать несколько реакций окисления, катализируемых металлами, которые повреждают белки,</p>	40

Антибактериальный агент	Высвобождаемые соединения	Механизмы антибактериального действия	ссылка
		мембраны или ДНК.	
	Zn	Ингибирование ферментативной активности	41, 42
неорганические соединения	Оксид азота	Оказывают нитрозативный и окислительный стрессы после диффузии через клеточные мембраны. Бактериальный сигнальный разрушитель. Короткий период полувыведения (секунды), требуется хороший контроль над параметрами высвобождения.	43-45
	Нанокomпозиты на основе $TiO_2$ и $TiO_2$	Фотокаталитически активируют выработку АФК	46

В идеале антибактериальное покрытие должно демонстрировать непрерывное высвобождение лекарственного средства в течение длительного времени и в эффективной дозировке, достаточной для борьбы с возможными скрытыми инфекциями [47-48]. Кроме того, очень важно, наблюдать основной выход антибиотиков из покрытий в течение первых 24 ч, чтобы противостоять начальному повышенному риску возникновения инфекции. Этот период соответствует критическому периоду после имплантации и периоду основной бактериальной адгезии.

Однако минусом данной стратегии является относительно не продолжительный период воздействия из-за ограниченной емкостной загрузки антибактериальных агентов в

покрытие. Исходя из этого в последние годы все чаще используют комбинированные подходы для создания антибактериальных покрытий пролонгированного действия.

В отличие от подхода высвобождения, покрытия с несколькими методами подавления бактерицидных инфекций не полагаются исключительно на высвобождение антибактериальных агентов, а вместо этого стремятся объединить механизмы воздействия для более безопасного и длительного эффекта. Этот подход успешно используется в последние годы [49]. Так, включение ионов серебра успешно сочетается с несколькими другими антибактериальными агентами: антибиотиками, металлами и их соединениями, генерирующими активные формы кислорода (АФК) и т. д. [41, 50-52]. Это можно объяснить множеством способов действия серебра на бактерии, что увеличивает вероятность синергетического эффекта. Однако на данном этапе прямое сравнение эффективности парных антибактериальных средств невозможно. Сравнительные исследования эффективности с более широким спектром соединений необходимы для разработки и выбора лучших комбинаций с синергетическими бактерицидным эффектом.

Сообщалось, о разработке покрытий, способных как высвобождать частицы серебра, так и механически воздействовать на бактерии [53]. Высвобождение серебра из покрытия обеспечивает сильный начальный эффект в течение первых нескольких дней, в то время как подложка сохраняет значительное механическое воздействие на патогены после истощения частиц Ag. Данная стратегия изучалась в различных комбинациях [54-55]. Также сообщалось о покрытиях, сочетающих как стратегию высвобождения, так и антиадгезионные свойства [56-58]. Имобилизация полиэтиленгликоля на поверхности антиадгезионного покрытия представляет собой очевидный и действенный способ придания антибактериальных свойств. Однако, несмотря на большое количество сообщений о конфигурации антибактериальных подходов в литературе, на сегодняшний день немногие платформы дошли до клинических исследований и еще меньше до клинической практики [59]. Это может быть связано с тем, что большинство современных методов *in vitro*, используемых для тестирования антибактериальных материалов, не включают реалистичные условия *in vivo* (иммунный ответ организма и т. д.) [48]. Для решения этих важных задач потребуются совместные усилия исследователей из разных дисциплин, чтобы обеспечить реальный прогресс в области биомедицины.

### **1.1.2 Материалы для разработки бактерицидных наночастиц**

В последние годы во всем мире выросло потребление антибиотиков. Это связано с увеличением заболеваемости населения из-за появления новых заболеваний, увеличением

продолжительности жизни и нерегулируемым потреблением безрецептурных лекарств. Все это приводит к появлению все большего числа устойчивых к антибиотикам бактерий [60-62]. Таким образом, разработка новых бактерицидных наночастиц, способных преодолеть лекарственную устойчивость без каких-либо дополнительных побочных эффектов для организма, является актуальной задачей. Насыщение наночастиц (НЧ) антимикробными компонентами, такими как антибиотики, пептиды и различные биомолекулы, и их доставка к месту воспаления в настоящее время является одним из наиболее успешных методов борьбы с инфекцией [63].

Наночастицы металлов и их оксиды широко используются для бактерицидной терапии. Они могут проявлять сильное и длительное антибактериальное действие даже в малых дозах в отношении широкого круга микроорганизмов [64]. Среди них наночастицы Ag обычно считаются лучшим выбором из-за их высокой терапевтической эффективности в отношении различных бактерий, грибов и вирусов. Сообщалось о трех основных механизмах бактерицидного действия наночастиц Ag: (i) взаимодействие наночастиц с клеточной мембраной и ее повреждение за счет образования активных форм кислорода, (ii) повреждение ДНК путем проникновения в бактериальную клетку и (iii) высвобождение ионов Ag и их накопление в клетке, приводящее к клеточному делению и нарушению целостности клеточной мембраны [65-69]. Токсичность наночастиц Cu/CuO в основном связана с высвобождением ионов Cu, которые взаимодействуют либо непосредственно с клеточной мембраной, либо действуют внутриклеточно, приводя к образованию свободных радикалов [70-73]. Несмотря на многообещающий терапевтический потенциал металлических наночастиц, их практическое применение ограничено рядом факторов. Например, наночастицы Ag могут накапливаться в органах человека (легкие, селезенка, почки, печень и мозг), что приводит к побочным эффектам [74]. Использование наночастиц TiO<sub>2</sub> может привести к повреждению ДНК, генетической нестабильности и пневмонии [75]. Когда бактерицидный эффект металлических наночастиц связан с высвобождением тяжелых металлов и сопутствующим формированием окислительного стресса, сообщалось о широком спектре физиологических дисфункций [76]. Благодаря биосовместимости и магнитным свойствам оксид железа (FeO) хорошо известен в биомедицинском секторе. Недавно были изучены антибактериальные свойства восстановленного железа и НЧ FeO, которые повреждают клетки бактерий за счет разрушения бактериальной мембраны и генерации окислительного стресса внутри клетки [77]. Характерная совместимость и безопасность НЧ ZnO на коже человека делает их подходящими добавками для косметики, тканей и поверхностей в непосредственной близости от кожи человека [78].

Различные полиэфирные, полиэфирные, олигосахариды и наночастицы на основе биоразлагаемых полимеров, такие как PEG - поли (этиленгликоль), PLA - поли (молочная кислота), PCL - поли ( $\epsilon$  капролактон), PLGA - сополимер лактида и гликолида, циклодекстрины и другие, загруженные или функционализированные активным бактерицидным компонентом, также были в центре внимания ряда работ [79-83]. Однако эти системы не всегда могут обеспечить сочетание требуемых специфических свойств, таких как иммуногенность, поверхностный заряд, высокая емкость загрузки лекарственного средства, пролонгированное высвобождение лекарственного средства, подходящие механические свойства, а также физико-химическая и долговременная стабильность. Поэтому поиск наиболее эффективных и безопасных материалов-наносителей для доставки бактерицидных агентов в очаги воспаления имеет большое научное и практическое значение.

### 1.1.2.1 Механизмы бактерицидного действия наночастиц

В таблице 2 приведены данные о механизмах подавления инфекций наночастицами на основе металлов и оксидов на их основе.

Таблица 2 – Механизмы действия металлических наночастиц

Материал наночастиц	Размер, нм	Механизм подавления инфекций	ссылки
Au	1-100	Снижение мембранного потенциала, нарушение дыхательной цепи, снижение активности аденозинтрифосфатазы, снижение связывание РНК с субъединицей рибосомы, повреждение клеточной мембраны	84-88
Ag	1-100	Образование активных форм кислорода; перекисное окисление липидов; разрушение бактериальной мембраны; ингибирование синтеза клеточной стенки; увеличение мембранной проницаемости; диссипация протонного градиента, приводящего к лизису; адгезия к клеточной поверхности, вызывающая повреждение липидов и белков; дестабилизация рибосом; интеркаляция между основаниями	85-89

		ДНК	
Cu	2-350	Диссипация мембранного потенциала, генерация АФК, липид перекисное окисление, окисление белков, деградация ДНК	85, 87-90
Si	20-400	Разрушение клеточных стенок через АФК	85, 88
Al	10-100	Разрушение клеточных стенок через АФК	86, 87
FeO	1-100	Окислительный стресс, вызванный генерацией АФК	87, 88
ZnO	10-100	Генерация АФК, разрушение мембраны, адсорбция на клеточной поверхности и повреждение липидов и белков	86, 87, 89, 91
TiO <sub>2</sub>	30-45	Генерация АФК, адсорбция на поверхности клетки	86, 87
MgO	15-100	Генерация АФК, перекисное окисление липидов, электростатическое взаимодействие, щелочное действие	86

Бактерицидная активность и токсичность металлических наночастиц зависит от размера частиц, формы, химического состава и заряда поверхности, степени агломерации, а также от механизмов клеточного поглощения и токсического ответа [92-94]. Как правило, более мелкие НЧ проявляют повышенную антибактериальную активность по сравнению с более крупными НЧ [95]. Грамположительные и грамотрицательные бактерии различаются по компонентам и структуре клеточных мембран и имеют разные пути адсорбции НЧ [96]. Восприимчивость бактерий к НЧ зависит от их биохимического состава, поскольку разные НЧ нацелены на разные биомолекулы [97]. Более того, быстрорастущие бактерии более чувствительны к НЧ или антибиотикам, чем медленно растущие. Это может быть связано с различной экспрессией генов реакции на стресс у быстрорастущих и медленно растущих бактерий [98, 99]. Отмечено, что антибактериальные эффекты НЧ более выражены в отношении грамположительных бактерий, чем в отношении грамотрицательных. Такой вывод может быть связан с тем, что непористые клеточные стенки грамотрицательных бактерий служат барьером для проникновения НЧ [100]. Клеточные стенки грамположительных бактерий с ковалентными связями с соседними белками и компонентами относительно пористые и позволяют проникать чужеродным молекулам [100].

### 1.1.2.2 Модификация поверхности наночастиц

В последние годы наночастицы пропитанные антибиотиками выступают как новый класс антибактериальных агентов, которые могут уменьшить проблему с множественными лекарственно-устойчивыми патогенными инфекциями. Многие наночастицы в сочетании с коммерчески доступными антибиотиками или пептидами были протестированы против устойчивых патогенных микроорганизмов [101]. В таблице 3 приведены некоторые разработанные наночастицы с терапевтическими препаратами и типы бактериальных штаммов, против которых они оказали эффективны.

Таблица 3 - Список наночастиц с терапевтическими препаратами и их эффективность против бактериальных штаммов

Тип наночастиц	Тип антибиотика	Бактериальный штамм	Ссылка
Ag	Гентамицин Ципрофлоксацин	<i>S. epidermidis</i>	102
	Эритромицин, Ампициллин	<i>E. coli</i> , <i>S. typhi</i> , <i>S. aureus</i> и <i>M. luteus</i>	103
	Триметоприм, гентамицин, ванкомицин и ципрофлоксацин	<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>M. luteus</i> , <i>A. baumannii</i> , <i>K. pneumoniae</i> и <i>Bacillus spp.</i>	104
	Цефазолин, мупироцин, гентамицин, неомицин, тетрациклин, ванкомицин	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> и <i>P. aeruginosa</i>	105
	Амоксициллин, пенициллин, колистин и гентамицин	<i>S. enterica</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>A. pleuropneumoniae</i> , <i>S. uberis</i> и <i>P. multocida</i>	106
	Цефтриаксон	<i>B. subtilis</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. typhi</i> и <i>P. fluorescens</i>	107
	Ампициллин, гентамицин, канамицин, стрептомицин и ванкомицин	<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> и <i>S. aureus</i>	108

Тип наночастиц	Тип антибиотика	Бактериальный штамм	Ссылка
	Ампициллин, хлорамфеникол и канамицин	<i>E. faecium</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> и <i>S. mutans</i>	109
	Ампициллин и амоксицилин	<i>S. typhi</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>M. luteus</i> и <i>L. lactis</i> ,	110
Au	Амоксициллин	<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermis</i> , <i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. cereus</i> и MRSA	111, 112
	Ципрофлоксацин, гентамицин, рифампицин и ванкомицин	<i>S. epidermidis</i> и <i>S. haemolyticus</i>	113
	Стрептомицин, неомицин, гентамицин и канамицин	<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> и <i>S. aureus</i>	114
	Метиленовый синий и полимер	MRSA и <i>E. coli</i>	115
Au	Гентамицин	<i>E. coli</i>	116, 117
	Ванкомицин	<i>E. coli</i> и VRE, VSSA, VRSA	118, 119
Ag-Au	Бацитрацин, канамицин, гентамицин, стрептомицин, эритромицин и хлорамфеникол	<i>B. subtilis</i> , <i>E. coli</i> и <i>K. pneumoniae</i>	120
Au: Ag-сплав	Канамицин и β-лактамы АТБ	<i>E. coli</i> , восприимчивый или устойчивый <i>S. aureus</i>	121
Au и Ag	Ампициллин	<i>S. aureus</i> , <i>E. faecium</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>A.</i>	122

Тип наночастиц	Тип антибиотика	Бактериальный штамм	Ссылка
		<i>baumannii</i> и <i>E. coli</i>	
Ag и CuO	Тетрациклин и канамицин	<i>B. subtilis</i> , <i>P. fluorescens</i>	123
Se	Ампициллин, оксациллин и пенициллин	<i>S. aureus</i> и MRSA	124
	Кверцетин и ацетилхолин	<i>S. aureus</i> и <i>E. coli</i>	125
ZnO	Ципрофлоксацин	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> и <i>K. sp.</i>	126
	Метициллин, ципрофлоксацин и эритромицин	<i>S. aureus</i>	127
	Амоксициллин, пенициллин G, нитрофурантоин и ципрофлоксацин	<i>S. aureus</i> и <i>E. coli</i>	128
	Карбоксиметил хитозан	<i>E. coli</i>	129
Одностенные углеродные нанотрубки	Антимикробный пептид, Ag-покрытие, модификации функциональных групп и амфотерицин В	<i>E. coli</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. neoformans</i> и <i>C. albicans</i>	130-132
Многостенные углеродные нанотрубки	Модификация функциональной группы, низин (пептид), AgNP с ПАМАМ, порфирин и амфотерицин В	<i>E. coli</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Candida parapsilosis</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> и <i>Candida albicans</i>	133-135
Фуллерен	Тейкоплагин	<i>E. coli</i> и <i>S. aureus</i>	136-138

Тип наночастиц	Тип антибиотика	Бактериальный штамм	Ссылка
(C <sub>60</sub> )			
Фуллерен-изониазидный конъюгат	Изониазид и ванкомицин	<i>Mycobacterium avium</i> и некоторые штаммы <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	139
Хиназолин-фуллереновый конъюгат	хиназолин	<i>M. tuberculosis</i>	140, 141
НЧ на основе хитозана	Темпорин В (пептид) и ванкомицин	<i>S. typhimurium</i> и <i>S. aureus</i> (VRSA, VSSA)	142, 145
НЧ на основе хитина	Этионамид, метациклин и рифампицин.	<i>E. coli</i>	144
ZnO	Ванкомицин или метициллин	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i> и MRSA	145
CdTe	Полимиксин В	<i>E. coli</i> и <i>S. aureus</i>	146
	Rocephin	<i>E. coli</i>	147
TiO	Пенициллин, гентамицин, ванкомицин, стрептомицин, эритромицин, клиндамицин и тетрациклин	<i>S. aureus</i> и MRSA	148
Оксид железа	Гентамицин	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i> и <i>P. areuginosa</i>	149

Применение наночастиц серебра (AgНЧ) в сочетании с различными антибиотиками усиливает их антибактериальный эффект. Многочисленные научные группы рассматривали возможность хелатирования антибиотиков с наночастицами через гидроксильные и амидные группы, которые присутствуют в молекулах антибиотиков [102, 151, 152]. Синергетический эффект химически синтезированных

AgНЧ в сочетании с ампициллином, хлорамфениколом и канамицином был подтвержден с помощью тестов на ингибирование биопленки на различных патогенных бактериях, включая *E. faecium*, *S. aureus*, *S. mutans*, *E. coli*, *P. aeruginosa* [109]. Другое исследование показало усиление бактерицидного эффекта после введения канамицина и тетрациклина, адсорбированных на AgНЧ, для экологически чистых бактерий *B. subtilis* и *P. fluorescens*. В другом исследовании было показано, что AgНЧ имеют хороший синергетический эффект с различными антибиотиками против прививочных инфекций *Escherichia hermannii*, *Citrobacter sedlakii* и *Pseudomonas putida* [152]. Тем не менее, не смотря на многообещающий потенциал, результаты ограничены.

Важными особенностями наночастиц на основе золота (AuНЧ) являются оптоэлектронные свойства, связанные с формой, большим отношением поверхности к объему и низкой токсичностью [153]. Было обнаружено, что отдельные AuНЧ не обладают каким-либо бактерицидным эффектом, но после присоединения антибиотиков этот эффект был подтвержден против *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *A. Baumannii* [154]. Механизм бактерицидного действия наночастиц золота с антибиотиками, точно не известен, но существует два предположения [111]. Первая идея заключается в нарушении осмотического баланса, который приводит к нарушению клеточной мембраны и ингибированию синтеза клеточной стенки бактерий [154]. Вторым механизмом, помимо связывания и проникновения в клеточную стенку, является проникновение AuНЧ в бактериальные клетки [155]. При попадании в бактериальную клетку нарушаются функции мембран, инактивация биоактивных белков и серно-фосфористых соединений при взаимодействии с нуклеиновыми кислотами и последующее торможение синтеза белка, что приводит к гибели клеток [111].

Модификация поверхности и функционализация наночастиц селена (SeНЧ) необходимы для определенного целевого действия [156]. Лишь в нескольких исследованиях изучалась активность наночастиц Se-антибиотик. Сообщалось, что наночастицы были синтезированы путем взаимодействия кверцетина ацетилхолина с поверхностью SeНЧ. Было подтверждено, что НЧ были прикреплены к бактериальной клеточной стенке, вызывая необратимое повреждение мембраны, приводя к гибели клетки. Эти данные свидетельствуют о том, что синергетические свойства кверцетина и ацетилхолина усиливают бактерицидную активность SeНЧ [125]. Несмотря на ограниченное количество проведенных исследований, можно предположить большой потенциал SeНЧ.

Бактерицидная активность наночастиц на основе оксида цинка (ZnОНЧ) была подтверждена в многочисленных исследованиях. Сообщалось, что НЧ с

ципрофлоксацином обладает превосходной бактерицидной активностью в отношении бактериальных штаммов *E. coli*, *S. aureus* и др. Механизм действия заключается в повреждении бактериальной клеточной мембраны.

Многие научные группы занимались оценкой наночастиц меди (CuОНЧ). Их эффект был подтвержден для многих бактериальных штаммов, таких как *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae* и *P. aeruginosa*, *M. luteus* [157-159].

Также известно, что хитозановые НЧ обладают бактерицидными свойствами и низкой токсичностью по отношению к клеточной линии человека [142]. Бактерицидные эффекты хитозановых НЧ были показаны против *E. coli*, *S. typhimurium* и *S. Aureus*. Механизм действия заключается в подавлении роста и активности ферментов, связывании хитозановых НЧ с отрицательно заряженной бактериальной поверхностью, таким образом, увеличивается проницаемость и начинается утечка клеток, что в конечном итоге помогает убивать клетки бактерии [150].

Обзор литературных данных подтверждает, что НЧ обладают большим потенциалом для лечения инфекций, однако остается несколько проблем для их клинического применения, таких как: изучение механизма взаимодействия НЧ с клетками, тканями и органами человека; оптимальная доза; распознавание соответствующих путей введения; токсичность после первичного и длительного воздействия [160-162]. Уникальная структура НЧ имеет явные преимущества по сравнению с обычными антибиотиками с точки зрения устойчивости к антибиотикам [163]. Текущее состояние НЧ демонстрирует большой потенциал для местного лечения кожных инфекций в ближайшем будущем. Были предприняты попытки нанести НЧ на контактные поверхности медицинских устройств, волокон и текстиля [163]. Однако системное введение НЧ по-прежнему требует решения множества аспектов [164]. Также, исследования механизмов внутриклеточного ингибирования остаются ограниченными. Окислительный стресс, индуцированный НЧ, заслуживает внимания, и лишь в нескольких исследованиях рассматривалось действие НЧ на экспрессию генов, синтез белка и метаболизм бактериальных клеток.

## **1.2 2D-материалы в биоинженерии**

Многофункциональность и широкий спектр свойств 2D-материалов способствовали их применению во многих областях биоинженерии [165, 166]. Графен и гексагональный *h*-BN являются архетипическими 2D материалами, которые привлекли внимание исследователей [167, 168]. Графен представляет собой аллотроп углерода,

состоящий из одного слоя атомов углерода, связанных  $sp^2$ -связями, расположенных в гексагональной решетке [169, 170]. Благодаря уникальными физико-химическими свойствами графена (большая площадь поверхности, высокая механическая прочность, тепло- и электропроводность) его все чаще используют в биомедицине [165]. Сообщалось о разработке антибактериальных покрытий, биосенсоров, системы доставки лекарств на основе графена [171-175]. Также было показано, что графен и оксид графена обладают сильными антибактериальными свойствами как против грамположительных, так и против грамотрицательных бактерий [166, 171]. Бактерицидная активность проявлялась за счет физического контакта наноструктур графена и оксида графена с мембраной бактерии. Кроме того, считается, что материалы на основе графена способны инициировать активные формы кислорода [176].

Нитрид бора представляет собой слоистый материал с сотовой структурой, аналогичной структуре графена, состоящий из ковалентно связанных атомов бора (B) и азота (N) [177]. BN обладает такими свойствами, как высокая гидрофобность, теплоизоляция, электроизоляция, низкая диэлектрическая проницаемость, устойчивость к окислению, высокая химическая стабильность и механическая прочность [178-181].

Сообщалось о разработке оптоэлектронных наноструктур, многофункциональных композиционных материалов, аккумуляторов водорода и изолирующих подложек на основе нитрида бора [182]. Учитывая структурную аналогию с графеном, считается, что BN и его производные обладают большим потенциалом для биомедицины.

В последнее время наблюдается большой интерес к синтезу и применению различных наноструктур (наночастиц, нанотрубок, нанолитов) на основе  $h$ -BN в качестве перспективных носителей лекарственных средств или антибактериальных покрытий [183-187].

Благодаря своим уникальным физическим, химическим и механическим свойствам наноструктуры гексагонального нитрида бора вызывают все больший интерес. Нано- $h$ -BN является многообещающим материалом для различных применений в качестве носителя катализатора, антибактериальной системы, субстрата для рамановской спектроскопии с усилением поверхности, носителя для доставки лекарств [188]. Использование наночастиц  $h$ -BN в биомедицинской сфере постоянно расширяется. Цитосовместимость наноструктур BN была в центре внимания многих исследований [189-192]. Носители BN обладают большим потенциалом для терапии рака и доставки бактерицидных агентов. Например, было показано, что наночастицы BN с высокоразвитой поверхностью являются многообещающими платформами для доставки противоракового препарата к опухолевым клеткам [193] и их разрушения [194]. Терапевтическое использование наноразмерных

материалов может нанести вред здоровью. Этот важный вопрос был в центре внимания недавнего исследования, показывающего, что наночастицы BN в концентрации ниже 100 мг/л могут быть использованы в качестве безопасного наноматериала в медицинских целях [195]. Однако данные об антибактериальных свойствах наноструктур BN не так утешительны. Было бы ошибочным полагать, что использование только одного терапевтического компонента или задействование только одного механизма клеточной гибели может обеспечить широкую защиту от различных бактериальных и грибковых инфекций. Подход, основанный на сочетании двух или более терапевтических компонентов, был успешно использован в ряде исследований [196-200]. Эти стратегии направлены либо на расширение антибактериального и противогрибкового действия на большее количество патогенов, либо на достижение синергетического эффекта.

Несмотря на многообещающие перспективы, использование материалов на основе BN в биомедицине значительно отстает от их аналогов на основе углерода. Также стоит отметить, что превосходная химическая инертность BN по отношению к углеродным наноструктурам является сильным аргументом в пользу использования этого материала в качестве замены углеродным наноструктурам в биомедицинских приложениях.

### 1.3 Постановка задачи исследования

Аналитический обзор литературы показал, что требуется разработка многофункциональных антибактериальных наноструктур, способных справляться с множественной лекарственной устойчивостью. Преодолеть эту устойчивость можно благодаря одновременному использованию нескольких механизмов подавления бактерицидных инфекций. Задачи предполагается достичь, создав наночастицы и наноструктурированные покрытия, модифицированные антибактериальными агентами в виде наночастиц металлов и антибиотиков широкого спектра действия. С целью разработки данных материалов будут использованы несколько подходов:

- создание наноструктурированных покрытий на основе *h*-BN;
- осаждение на поверхность покрытий наночастиц Ag, Fe;
- иммобилизация на поверхности покрытий терапевтических препаратов (гентамицина, амфотерицина В);
- создание НЧ на основе *h*-BN;
- осаждение на поверхности НЧ Ag и иммобилизация гентамицина и амфотерицина В.

Наноструктурированные покрытия будут созданы для придания бактерицидных свойств поверхности в борьбе с множественной лекарственной устойчивостью. Ag и Fe будут осаждены на поверхности покрытия для повышения антибактериальных и противогрибковых свойств. Осаждение Ag на поверхность наночастиц будет осуществляться для придания антибактериальных свойств. Имобилизация антибиотиков на поверхности НЧ будет осуществляться для увеличения бактерицидных и фунгицидных свойств наноструктур. Предполагается подобрать минимальные ингибирующие концентрации антибактериальных агентов для уменьшения пагубного воздействия на организм. Важно оценить действие на бактерии всех антибактериальных механизмов и подобрать оптимальные комбинации и концентрации антибактериальных агентов.

## ГЛАВА 2. Методы получения и исследования свойств материалов

### 2.1 Синтез покрытий на основе *h*-BN

Наноструктурированные покрытия на основе *h*-BN были получены реакцией взаимодействия газообразного аммиака с НЧ аморфного бора, нанесенными на кремниевую подложку. В качестве прекурсоров использовали аморфный бор (99,0 %, «Авиабор», Российская Федерация), состоящий из сферических частиц диаметром примерно 0,15–0,9 мкм, и газообразный аммиак (99,98 %). Суспензию аморфного бора в дистиллированной воде в виде тонкого слоя (толщиной около 100 мкм) наносили на кремниевые пластины 1,0 x 1,0 см<sup>2</sup> с помощью ракеля (дозатора) и сушили на воздухе в течение 20 мин. Далее образцы помещались на пластину BN, которую затем перемещали в изотермическую зону реактора. При этом использовалась высокотемпературная установка горизонтального трубчатого реактора (рисунок 1) для синтеза с резистивным нагревом и максимальной температурой рабочей зоны 1450°C. Реактор откачивали до остаточного давления  $1 \times 10^{-3}$  атм. и подавали аммиак до достижения парциального давления аммиака 1 атм. Реактор нагревали со скоростью 275°C/ч до температуры 1300°C. Образцы выдерживали при 1300 °C в течение 1 ч, после чего реактор охлаждался в естественных условиях до комнатной температуры.

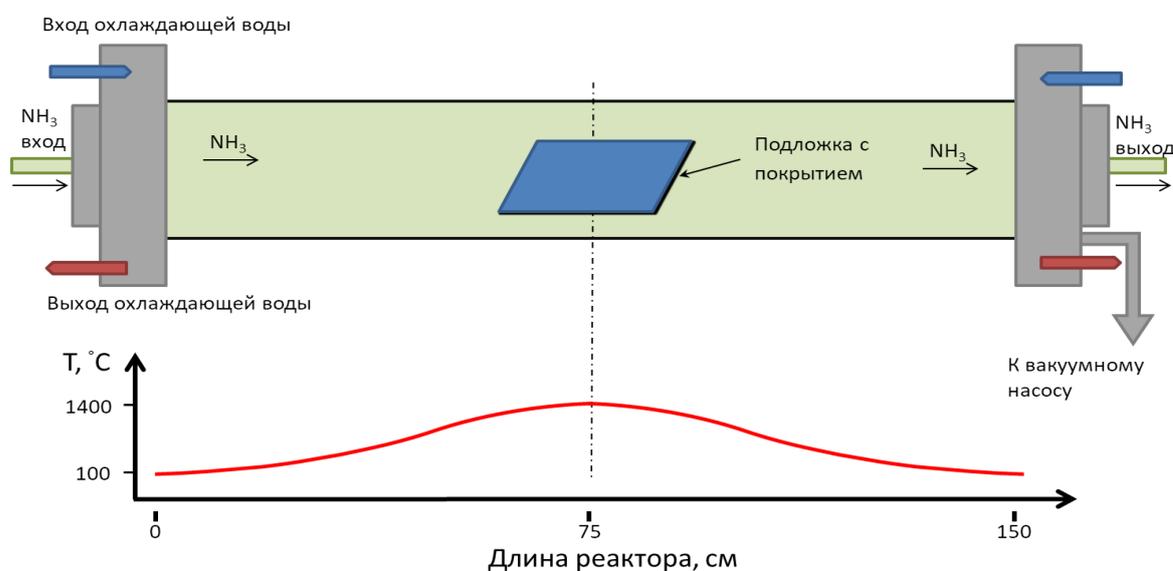
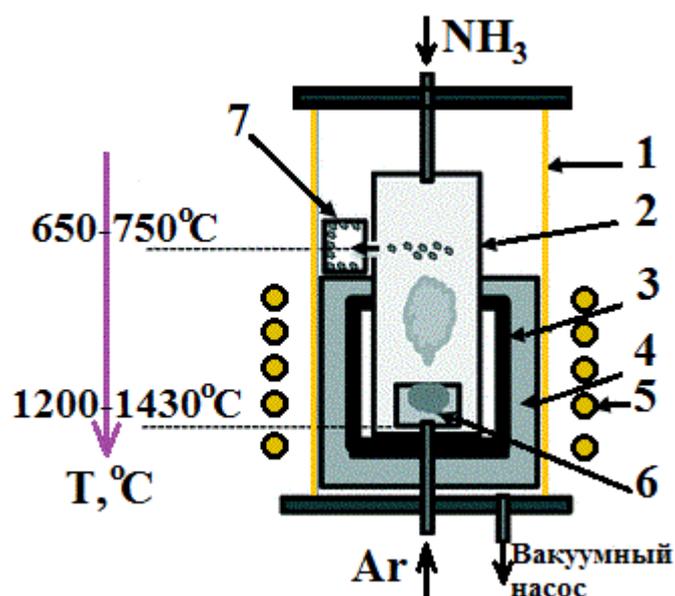


Рисунок 1 - Схематическое изображение экспериментальной установки с температурным профилем внутри реактора, измеренным для заданной температуры 1400 °C

## 2.2 Газо-фазовый синтез наночастиц на основе *h*-BN

НЧ на основе *h*-BN были получены методом химического осаждения из газовой фазы (CVD) в вертикальном реакторе с индукционным нагревом (рисунок 2) (ВАК ЭТО, Россия). CVD – метод получения наноструктур повышенной чистоты, основой которого является протекание химической реакции. Основным методом синтеза нитрида бора является метод химического осаждения при взаимодействии аммиака с парами оксида бора (BO, B<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), образующегося в результате термической диссоциации бороксидного прекурсора (B:MgO:FeO = 3,5:0,1:1). Метод CVD используется для производства высококачественных наноструктур повышенной чистоты, в основе метода лежит протекание химической реакции.



Конфигурация оборудования: 1 - топочная камера SiO<sub>2</sub>, 2 - реактор BN, 3 - графитовый токоприемник (нагревательный элемент), 4 - графитовая теплоизоляция, 5 - индуктор, 6 - тигель-прекурсор и 7 - коллекторный тигель BN. Поток газа: NH<sub>3</sub> (сверху) и Ar (снизу). Измеренный экспериментально температурный профиль по высоте реактора показан слева

Рисунок 2 – Вертикальный реактор с индукционным нагревом CVD

Температура синтеза варьировалась в диапазоне от 1200 до 1430 °С. Поток аммиака устанавливался в диапазоне от 30 до 150 см<sup>3</sup>/мин, а соотношение потоков Ar/NH<sub>3</sub> поддерживалось от 2 до 6. Синтез проводился в течение 6–7 часов. После синтеза реактор естественным образом охлаждали до комнатной температуры в атмосфере аргона.

После синтеза НЧ BN сформировывали агломераты. Для разделения агломератов на отдельные НЧ проводили обработку ультразвуком в растворе дистиллированной воды (концентрация BN 2 мг/мл) с использованием установки Bandelin Sonoplus HD2200 (Германия) при мощности 80 Вт в течение 30 минут.

### 2.3 Осаждение Ag на поверхность наночастиц *h*-BN

Осаждение серебра (Ag) на поверхность НЧ *h*-BN осуществлялось методом ультрафиолетового разложения нитрата серебра (AgNO<sub>3</sub>). Для получения наногрибидов BN/Ag 50 мг AgNO<sub>3</sub> добавляли к 100 мг BN и облучали ультрафиолетовым (УФ) светом с использованием УФ-лампы с длиной волны  $\lambda = 185$  нм в течение 20 мин. Затем, полученный порошок промывали водой 10 раз с повторным центрифугированием при 9000 об/мин в течение 15 мин и сушили в изопропанол.

### 2.4 Осаждение частиц переходных металлов на покрытия *h*-BN

Осаждение наночастиц Ag на поверхность покрытий *h*-BN осуществлялось в процессе термического разложения нитрата серебра (AgNO<sub>3</sub>). Вначале на поверхности *h*-BN равномерно распределяли суспензию нитрата серебра в изопропанол различной концентрации и оставляли до полного высыхания раствора на воздухе. Далее образцы помещали в изотермическую зону трубчатой печи Nabertherm R50/500/12/B180 (Германия), разогретой до температуры 350 °С и выдерживали в течение 10 минут. Концентрация частиц Ag составляла 6, 12, 18, 25, 50 и 100 мгк/см<sup>2</sup>. Осаждение НЧ Fe осуществлялось в процессе восстановления в водороде предварительно осажденного на *h*-BN хлорида железа (FeCl<sub>3</sub>) различной концентрации. После полного высыхания растворов образцы помещали в изотермическую зону горизонтального трубчатого реактора CVD. Реактор откачивали до остаточного давления  $1 \times 10^{-3}$  атм. и подавали аргон при достижении парциального давления 1 атм. Затем подавали водород со скоростью потока 6 л/ч до и эту скорость потока поддерживали в течение всего процесса синтеза. Далее реактор нагревали до 350 °С, выдерживали в течение 2 часов и охлаждали до комнатной температуры. Концентрация частиц Fe составляла 30, 50, 150, 300, 500 и 700 мгк/см<sup>2</sup>.

### 2.5 Пришивка антибиотиков на поверхность покрытий *h*-BN

Образцы загружали сульфатом гентамицина (Белмедпрепараты, Республика Беларусь) и амфотерицином В (Синтез, Россия). Гентамицин является антибиотиком широкого спектра действия и применяется при острых инфекциях средней и тяжелой степени, вызванных широким спектром грамположительных и грамотрицательных бактерий, включая *Pseudomonas* [201]. Были проведены предварительные эксперименты для определения минимальной ингибирующей концентрации (МИК = 128 мкг/мл)

гентамицина, обеспечивающей эффективную защиту от устойчивого к антибиотикам штамма *E. coli* K-261. Это значение МИК хорошо согласуется с распределением МИК, зарегистрированным для *E. coli*, которые были положительными в отношении генов устойчивости к гентамицину  $aac(3) - II$ ,  $aac(3) - IV$  и  $ant(2'')$  - I ( $8 - >512$  мг/л) [202-203]. Амфотерицин В известен как полиеновый макроциклический антибиотик, проявляющий противогрибковую активность [204]. Концентрация амфотерицина В была выбрана на основании имеющихся данных о его влиянии на грибок *N. Crassa* [205]. Для получения растворов антибиотика 1 мл гентамицина и 50 мг амфотерицина В растворяли в 3 и 10 мл дистиллированной воды соответственно. Затем на поверхность образцов наносили по 15, 30 и 50 мкл (гентамицин) и 20 мкл (амфотерицин В). Соответствующие нагрузочные дозы (Ld) составляли 150, 300 и 500 мкг/см<sup>2</sup> (гентамицин) и 20 и 100 мкг/см<sup>2</sup> (амфотерицин В). Нагруженные антибиотиками покрытия выдерживали в вакууме в течение 120 мин, промывали в дистиллированной воде и, наконец, сушили.

## 2.6 Функционализация поверхности наночастиц *h*-BN антибиотиками

НЧ BN и BN/Ag нагружали антибиотиками гентамицин сульфатом (Белмедпрепараты, Республика Беларусь) и амфотерицином В (Синтез, Россия). Для насыщения НЧ BN и BN/Ag антибиотиками готовили водные суспензии НЧ BN с концентрацией 1 мг/мл. Концентрация растворов гентамицина и амфотерицина В составляла 1 мг/мл. К суспензии НЧ BN добавляли различные количества растворов антибиотиков для получения различных нагрузочных доз. Первоначально нагрузочная доза антибиотика в суспензиях BN варьировалась от 0 до 20 масс. % и фиксировались значения дзета-потенциала и размера наночастиц, которые определялись с использованием прибора Zetasizer Nano-ZS ZEN3600 (Malvern, Великобритания). На основании полученных результатов (учитывались минимальные значения дзета-потенциала и отсутствие агломерации НЧ) для каждого типа антибиотика были выбраны три оптимальные нагрузочные дозы: 4, 6 и 8 масс. % (гентамицин) и 1, 2, и 3 масс. % (амфотерицин В). Суспензии инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин. Полученный порошок промывали водой 10 раз с повторным центрифугированием при 9000 об/мин в течение 15 мин.

## 2.7 Изучение структуры и химического состава поверхностей

Морфология поверхностей покрытий и НЧ была проанализирована методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) с использованием сканирующего электронного микроскопа JSM-7600F (JEOL, Япония) при ускоряющем напряжении 15 кВ. Также был изучен элементный состав поверхностей с помощью рентгеновского микроанализатора INCAx-sight.

Структура поверхности образцов была проанализирована с использованием просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) с использованием микроскопа FEI Tecnai G2 Spirit Twin, работающего при 120 кВ.

Химические связи на поверхности были изучены с использованием ИК-Фурье-спектроскопии в режиме полного внутреннего отражения с использованием вакуумного спектрометра Vertex 70V (Bruker) в диапазоне 400-4000  $\text{см}^{-1}$  с разрешением 4  $\text{см}^{-1}$ .

Химический состав образцов был проанализирован с помощью рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии (РФЭС) с использованием спектрометра Kratos XPS (Shimadzu), снабженного монохроматическим источником рентгеновского излучения Al K $\alpha$  ( $h\nu = 1486,6$  эВ). Во время измерений базовое давление внутри камеры поддерживалось постоянным при  $5 \times 10^{-9}$  Торр. Измерения РФЭС проводились с использованием зарядного нейтрализатора без предварительного травления поверхностных ионов. Полученные спектры РФЭС были проанализированы с смещением масштаба энергии связывания (BE) для получения положения пика C-1s при 285,0 эВ (для образцов без вклада графита) и пика C - C при 284,4 эВ (для образцов с графитом). Идентификация спектров РФЭС по B1s, N1s, O1s, C1s, Ag3d, Fe2p была выполнена с помощью программного обеспечения CasaXPS, после вычитания фона типа Ширли, используя пики Гаусса-Лоренца (G-L) с фиксированным процентом G-L 30 для большинства пиков.

## 2.8 Методика изучения смачиваемости поверхности покрытий

Краевой угол смачивания (КУС) наноструктурированных покрытий был измерен с помощью метода лежащей капли на установке Easy Drop Kruss (KRÜSS, Германия), оснащенной системой визуализации видео. Для каждого образца были проанализированы десять капель по 5 мкл в объеме, результаты были усреднены.

## 2.9 Методика изучения выхода антибиотиков в буферные растворы

Кинетика высвобождения антибиотиков была изучена в нейтральной (pH 7,4) среде. Образцы покрытий с антибиотиками были погружены в колбы, заполненные 10 мл фосфатно-солевым буферным раствором при комнатной температуре. Для анализа концентраций антибиотиков 500 мкл каждого супернатанта собирали через 1, 3, 6 и 12 ч, а дальше через 1, 3, 5, 7, 9, 11 и 14 дней. После каждой выборки объем раствора был увеличен до начального, добавляя 500 мкл свежего фосфатно-солевого буферного раствора. Кинетика выхода антибиотиков изучалась с помощью УФ-спектрофотометра (Ocean Optics, США). Измерения проводились в диапазоне длин волн 0-1000 нм. Максимальные интенсивности поглощения для гентамицина и амфотерицина В составляли 230 и 380 нм соответственно, которые использовались для дальнейших исследований. Чтобы построить калибровочную кривую, измеряли поглощение растворов антибиотиков с концентрациями в диапазоне от 0,005 до 4 мг/мл. Концентрацию антибиотиков, высвобождаемых в PBS со временем, оценивалась путем сравнения с калибровочной кривой. Эксперименты по выходу препаратов были проведены в трех повторах для каждого типа антибиотика.

Количество терапевтического агента, также определяли методом жидкой хроматографии (LC). Данные LC-MS/MS были получены с использованием жидкостной хроматографической системы (Dionex Ultimate 3000), подключенной к масс-спектрометру AB SCIEX QTRAP 3200 (AB SCIEX, CANADA). Скорость потока была установлена на 0,3 мл/мин, а объем впрыска составлял 5 мкл. Мобильные фазы А и В состояли из 0,1% муравьиной кислоты в воде и ацетонитрил, соответственно. Хроматограммы для гентамицина были получены в изократическом режиме с ацетонитрильным содержанием 5%. Хроматографическое разделение проводилось на Acclaim RSLC (150 мм; 2,1 мм; 2,2 мм; Dionex, США). Хроматограммы для амфотерицина В были получены в режиме градиента. Был применен следующий градиент элюирования: 0-2 мин (95% А), 2-10 мин (95% А - 50% А), 10-12 мин (50% А - 95% А), 12-18 мин (95% а). Хроматографическое разделение проводилось на прокладке Pack Velox PFPP (100 мм 2,1 мм, 2,7 мм, Shimadzu, Япония). Водные растворы аналитов использовали в концентрациях, находящихся от 2 мкг/мл<sup>-1</sup> до 15 мкг/мл<sup>-1</sup> (гентамицин) и от 1 мкг/мл<sup>-1</sup> до 26 мкг/мл<sup>-1</sup>, чтобы построить калибровочные кривые. Каждая калибровочная кривая была построена путем линейной регрессии с значением R<sup>2</sup> > 0,99.

## **2.10 Методика изучения выхода ионов металлов в физиологический раствор**

Концентрация ионов металлов, выделяемых из покрытий и наночастиц в фосфатно-солевом буферном растворе (рН 7,4), изучалась методом масс-спектропии с индуктивно связанной плазменной (ICP-MS) с использованием прибора X-Serial II (Thermo Fisher Scientific). Образцы погружали в колбы, заполненные 10 мл фосфатно-солевым буферным раствором и хранили при комнатной температуре. Для анализа концентрации выпущенных ионов 1 мл раствора отбирали после 3, 8 и 24 ч выдержки. После каждой выборки объем раствора был увеличен до исходного, добавляя 1 мл свежего фосфатно-солевого буферного раствора. Эксперименты по выпуску ионов были выполнены по три повтора, а результаты были усреднены.

## **2.11 Методика измерения количества АФК**

Перед измерением концентрации активных форм кислорода (АФК), образцы были подвергнуты УФ-облучению бактерицидной лампой АНК 170/70-ПЗ-3 (ЛИТ Фонон) с длиной волны 253,7 нм и мощностью 50 Вт в течение 60 мин (для моделирования условий стерилизации образца). Затем образцы (с УФ-облучением и без него) помещали в 3 мл физиологического раствора. Аликвоты (250 мкл) собирали через 0, 3, 8 и 24 ч и добавляли к смеси 100 мкл растворов хлорида железа (10 мкмоль) и 100 мкл растворов 2,7-дигидрохлорида флуоресцеина (5 мкмоль). Конечный раствор доводили до 1 мл и измеряли концентрацию флуоресцеина с использованием флуоресцентного спектрофотометра Cary Eclipse (Agilent Technologies) с использованием длин волн возбуждения и испускания 492 нм и 500-600 нм соответственно. Эксперименты повторяли минимум три раза для каждого типа образцов, а результаты были усреднены.

## **2.12 Методика изучения контактного-взаимодействия материалов с бактериями**

Свежую бактериальную взвесь ( $7 \times 10^6$  КОЕ/мл) центрифугировали при 6000 об/мин в течение 5 мин. Образовавшийся осадок растворяли в 0,5 мл физиологического раствора. Затем в 24-луночный культуральный планшет с образцами вносили 0,03 мл бактериальной взвеси. Через 3 ч инкубации верхний слой пленки осторожно соскабливали пипеткой с наконечником, затем 0,01 мл суспензии распределяли по сетке для ПЭМ, высушивали и фиксировали 3% формальдегидом. После сушки в течение 5 мин сетку

промывали 3 раза дистиллированной водой и окончательно сушили сначала на воздухе в течение 10 мин, а затем в вакуумной камере в течение 20 мин. Анализ образцов был выполнен на сканирующем электронном микроскопе.

## ГЛАВА 3. Разработка антибактериальных покрытий в системе *h*-BN/*Me*/антибиотики

### 3.1 Получение наноструктурированных покрытий *h*-BN

#### 3.1.1 Анализ структуры покрытий методами СЭМ, ПЭМ

В качестве исходного материала использовали порошок бора размером от 0,2 до 1 мкм (рисунок 3а). Анализ СЭМ показывает, что покрытия после синтеза состоит из сферических НЧ размером 150-550 нм (рисунок 3б). Увеличенные СЭМ-изображения показывают, что поверхность НЧ образована многочисленными наноиглами/нанолистам (рисунок 3б (вставка)) толщиной от 5 до 15 нм. Анализ энерго-дисперсионных спектров (ЭДС) (не показан) подтверждает, что основными компонентами покрытий являются бор и азот, 73,5 и 25,4 ат.% соответственно. Избыток бора свидетельствует о том, что в нижних слоях покрытий не завершилась реакция взаимодействия бора с аммиаком, приводящая к образованию BN. Обнаружены также примеси кислорода (0,7 ат.%) и кремния (0,4 ат.%).

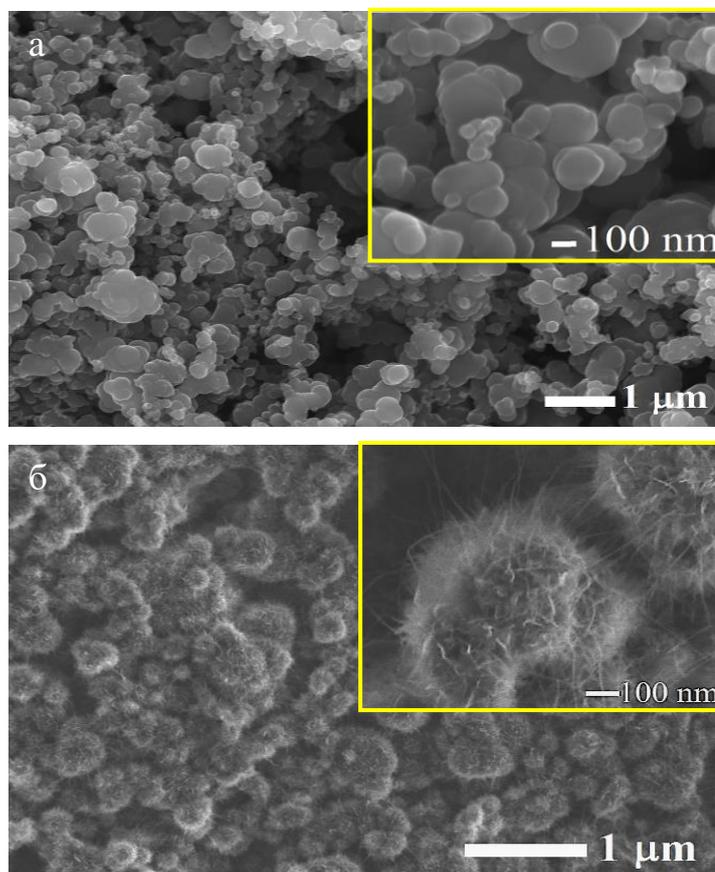


Рисунок 3 – СЭМ-изображения прекурсора порошка В (а) и покрытия BN (б)

Малое увеличение и ПЭМ-изображение высокого разрешения, а также картина дифракции электронов на выбранной области отдельных частей покрытия BN представлены на рисунке 4. Внутри НЧ BN можно выделить три характерные зоны (рисунок 4а). Структуру ядра можно описать как турбостратный BN (*t*-BN) [206], поскольку он состоит из сильно разупорядоченных  $sp^2$ -связанных нанозерен BN размером в несколько нм. Доминирующий контраст полос возникает из-за базисных плоскостей, которые ориентированы ребром и имеют сильный локальный изгиб из-за многочисленных краевых дислокаций (как показано символом  $\perp$  на рисунке 4в). Внутри *t*-BN зафиксированы две структурные модификации BN, а именно гексагональной BN (*h*-BN) и ромбоэдрической BN (*r*-BN), которые отличаются только последовательностью размещения базисных плоскостей [207]. На рисунке 4в отчетливо видно, что большинство зёрен BN, связанных  $sp^2$ , имеют конфигурацию *r*-BN. Это следует из того, что угол между плоскостями (100) и (101) *r*-BN равен  $77,7^\circ$ , а плоскости (002) и (100) в *h*-BN ортогональны. В средней части наночастицы BN наблюдается ориентация базисных плоскостей в основном параллельно радиусу наночастиц (рисунок 4а (левая вставка)). Это указывает на то, что наноструктуры BN ориентрованы преимущественно по диаметру НЧ (рисунок 4е). Многочисленные нанопластины и наноиголки толщиной 5-15 атомных слоев сформировали поверхность НЧ BN (рисунок 4б, г, д).

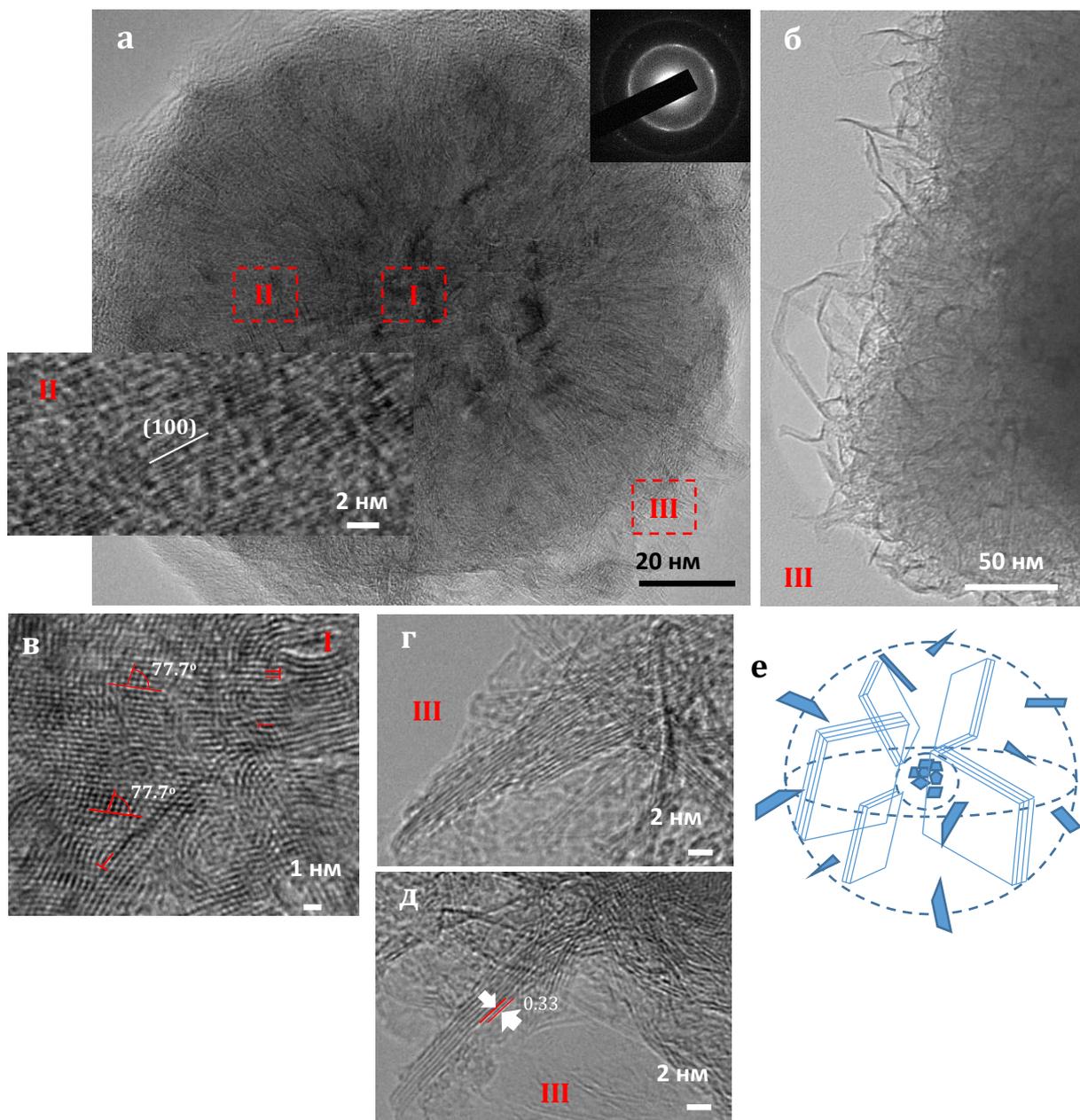


Рисунок 4 – ПЭМ (а, б) и ПЭМ изображения высокого разрешения (в-д) НЧ VN с игольчатой поверхностью, из которых состоит покрытие VN, и схематическое изображение его структуры (е)

### 3.1.2 Исследование поверхности покрытий методами ИК-Фурье спектроскопии, РФЭС

ИК-спектр покрытий (рисунок 5а) показывает пики, соответствующих валентными колебаниям В–N ( $1370\text{ см}^{-1}$ ), деформационным колебаниям В–N–В ( $780\text{ см}^{-1}$ ), а также колебания связи О–В–О ( $690\text{ см}^{-1}$ ) [208]. Спектры РФЭС В1s и N1s (рисунок 5б, в) высокого разрешения покрытий VN показывают только один пик с энергией связи  $190,85$  (В1s) и  $398,45$  (N1s) эВ, указывающий на связи VN. Спектр РФЭС O1s (рисунок 5г) подтверждает результаты анализа ЭДС и ИК-спектроскопии и показывает пик с энергией

связи 532,52 эВ указывающий на связь В–О. Элементный состав, определенный с помощью РФЭС, также подтверждает, что покрытие состоит из В (40.17%), N (51.81%), С (4.99%) и О (3.03%).

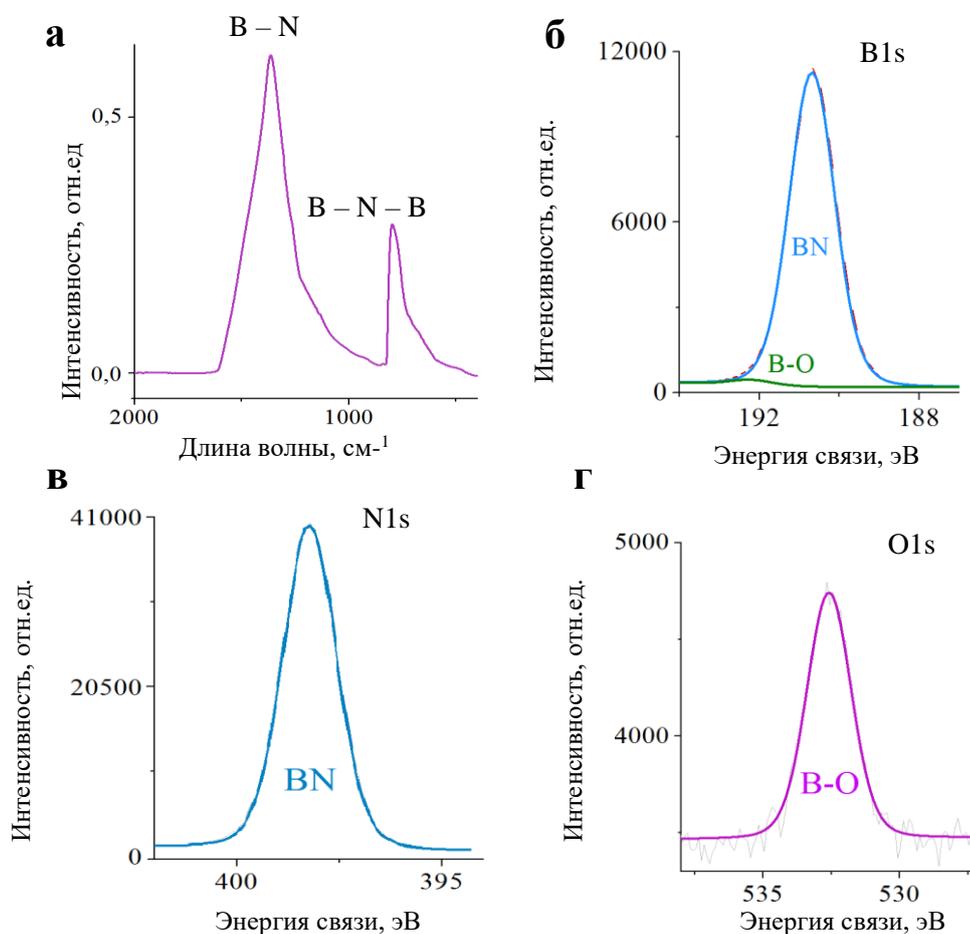


Рисунок 5 – ИК-спектр (а) и РФЭС (б-г) спектры покрытий BN

## 3.2 Получение покрытий *h*-BN/Me

### 3.2.1 Исследование структуры и состава покрытий методами ПЭМ, РФЭС

ПЭМ изображения нанокomпозитов BN/Ag6, BN/Ag12 и BN/Ag18 представлены на рисунке 6. Соответствующие карты ЭДС Ag доказывают наличие наночастиц Ag от 2 до 6 нм на поверхности BN. Плотность наночастиц Ag увеличивается с увеличением концентрации Ag, в то время как размер заметно не изменяется.

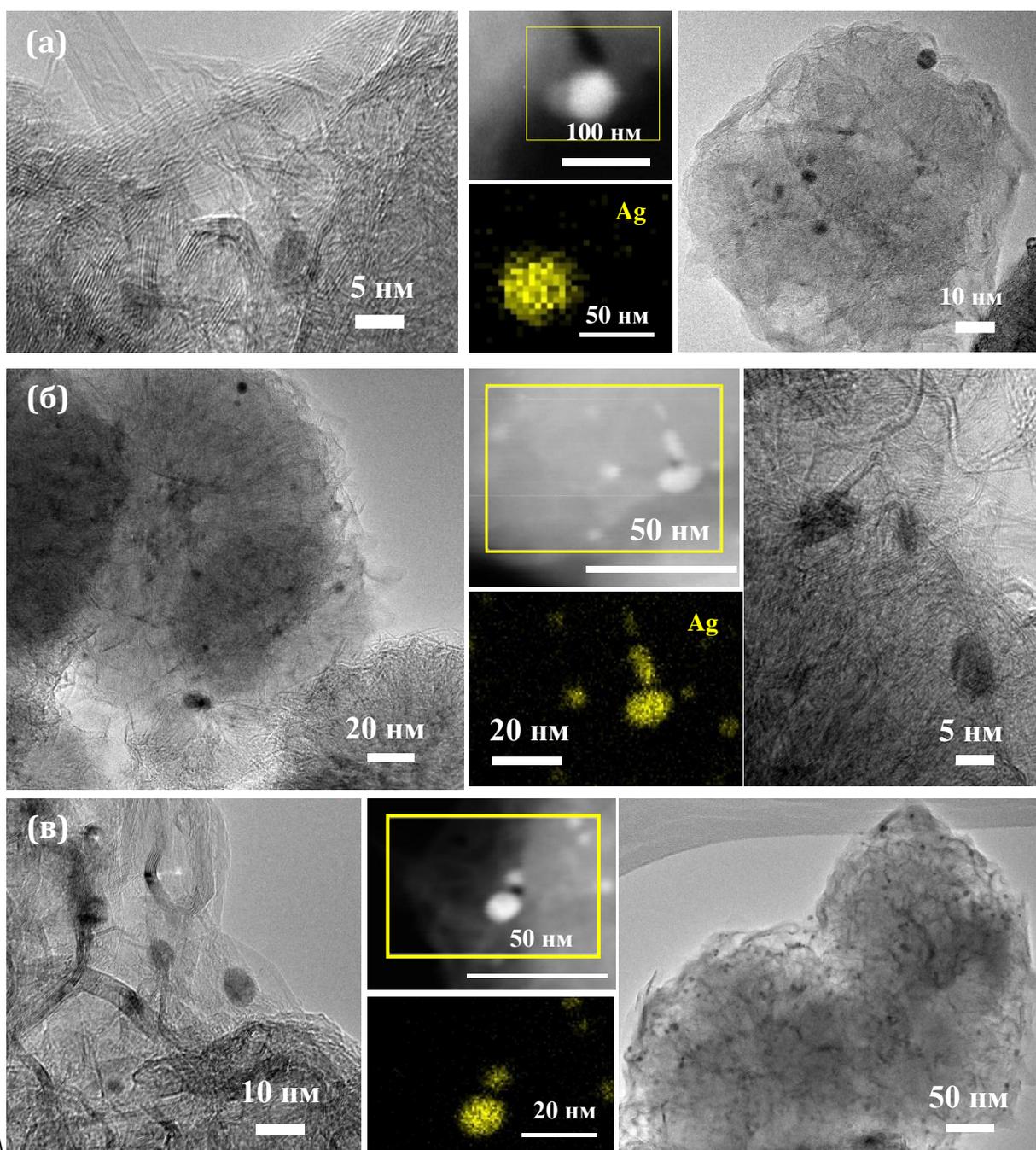


Рисунок 6 – ПЭМ-изображения нанокompозитов BN/Ag<sub>6</sub> (а), BN/Ag<sub>12</sub> (б) и BN/Ag<sub>18</sub> (в)

Морфология фазы на основе Fe на поверхности покрытий *h*-BN была совершенно иной (рисунок 7). Фаза на основе Fe выпадает либо в виде стержнеобразных наночастиц, либо образует тонкую пленку, покрывающую поверхность BN. Локальный ЭДС-спектр предполагает образование фазы оксида железа (рисунок 7а). НЧ BN имеют расстояние между гексагональными плоскостями 0,34-0,36 нм. В фазе оксида железа обнаруживаются полосы решетки с межплоскостными расстояниями  $d$  0,30-0,32 нм и 0,26-0,27 нм. Хотя наблюдаемые значения межплоскостного расстояния могут принадлежать разным фазам оксида железа, например, кубической  $\gamma$ -Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, тетрагональной  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> и орторомбической  $\epsilon$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, наилучшее соответствие соответствует фазе  $\epsilon$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (т.п.-542896,  $a=0,521$ ). нм,

$b=0,895$  нм,  $c=0,960$  нм,  $d=0,32$  нм (121),  $d=0,30$  нм (013),  $d=0,277$  нм (122) и  $d=0,260$  нм (200)). Это предположение дополнительно подтверждается ПЭМ изображением, представленным на рисунке 7б. Падающий пучок близок к  $[031\bar{1}]$ , а доминирующий контраст полос возникает в перпендикулярных плоскостях (013) и (200) с  $d$  0,30 и 0,26 нм соответственно. Фазу  $\epsilon\text{-Fe}_2\text{O}_3$  можно рассматривать как промежуточный полиморф, имеющий сходство как с  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , так и с  $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$  [209].

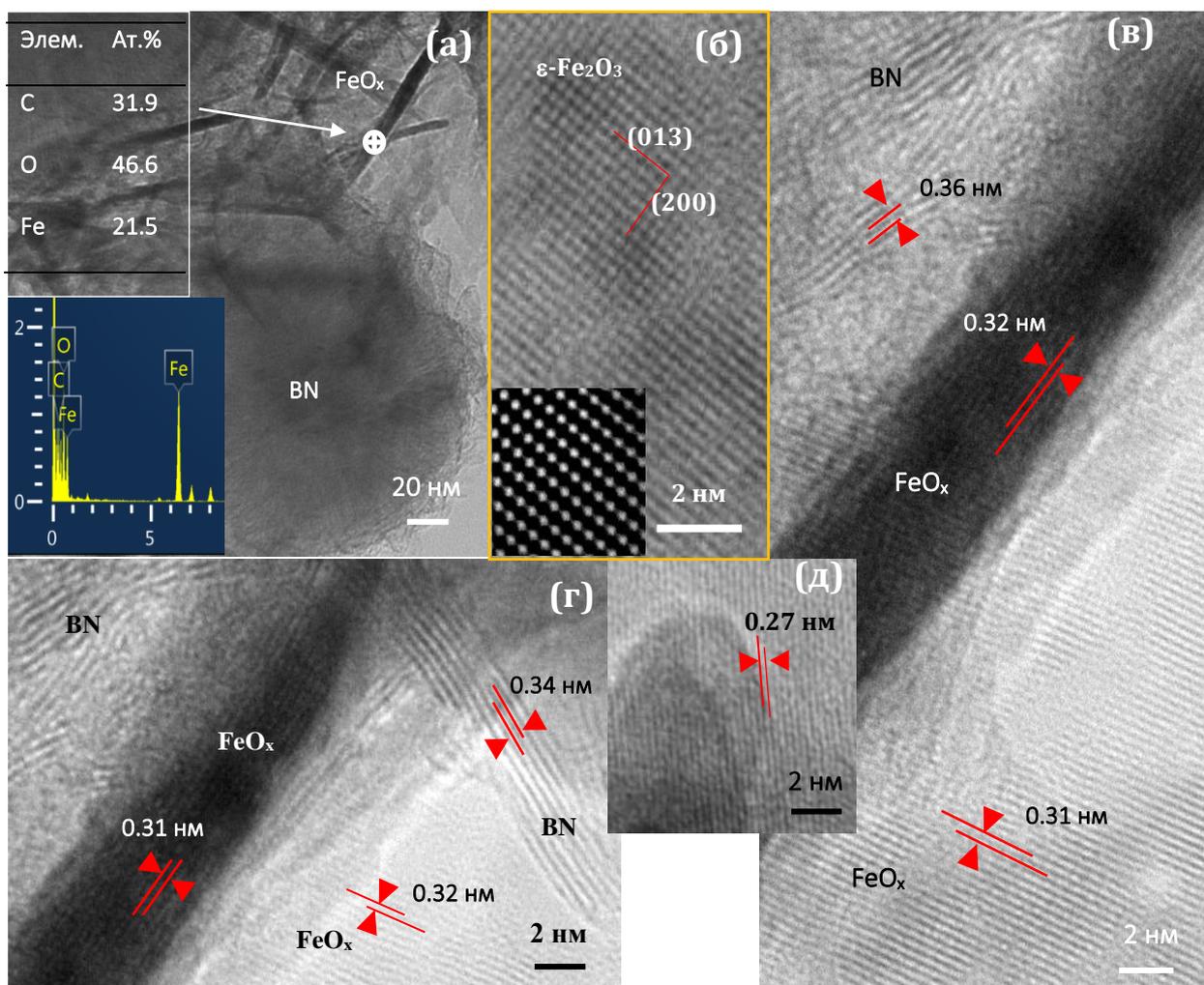


Рисунок 7 – ПЭМ (а) и ПЭМ изображения высокого разрешения (б-д) нанокompозита BN/Fe150. На вставках представлен ЭДС спектр указанной области (а) и картина электронной дифракции, полученная с использованием обратного преобразования Фурье с ПЭМ изображения высокого разрешения (б)

РФЭС-анализ был использован для определения химических связей и элементного состава покрытий  $h\text{-BN}$  с НЧ Fe, Ag на поверхности. Полученные результаты представлены в таблице 4, 5. РФЭС-спектры покрытий BN/Ag (рисунок 8) содержат пики, соответствующие нитриду бора, так по B1s и N1s зафиксированы связи BN при 190,85 эВ и 398,45 эВ соответственно. Наличие оксидной фазы, подтверждается пиком по O1s при 532,52 эВ, принадлежащем фазе B-O. В спектре Ag3d обнаружены характерные пики для

Ag3d 5/2 и Ag3d 3/2 (при энергиях связи 368,74 и 374,77 эВ соответственно) [210], что свидетельствует о то, что образование металлического серебра хорошо согласуется с результатами элементного состава, полученными ПЭМ. Содержание элементов, полученное в результате РФЭС-анализа, представлено в таблице 4. Можно также заметить, что с увеличением концентрации осажденных наночастиц Ag с 6 до 18 мкг относительное содержание увеличилось с 2,93% до 13,62 % соответственно.

Таблица 4 – Атомный состав образцов, полученный по данным РФЭС

образец	концентрация, ат.%					
	<b>B</b>	<b>N</b>	<b>O</b>	<b>C</b>	<b>Ag</b>	<b>Fe</b>
BN/Ag6	35,62	56,27	3,11	2,07	2,93	-
BN/Ag12	32,19	55,82	3,34	2,13	6,52	-
BN/Ag18	24,92	54,61	4,12	2,73	13,62	-
BN/Fe30	29,34	57,26	4,52	2,24	-	6,64
BN/Fe50	24,71	54,65	6,46	2,89	-	11,29
BN/Fe150	18,16	50,13	8,4	3,36	-	19,95

На рисунке 9 показаны РФЭС спектры B1s, N1s, O1s и Fe2p образцов BN/Fe30, BN/Fe50 и BN/Fe150. РФЭС спектры по B1s и N1s при 190,6 эВ и 398,2 эВ соответственно принадлежат *h*-BN. РФЭС спектры O1s были аппроксимированы с использованием двух компонентов при 530,4 эВ (Fe-O) [211] и 532,5 эВ (B-O). Сообщается, что положения пиков по O1s фаз Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> и Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> составляют 529,9 и 530,1 эВ соответственно [212]. Спектры РФЭС Fe2p показывают два отчетливых дублетных максимума с центрами приблизительно 710,9–711,2 эВ (Fe2p<sub>3/2</sub>) и 724,9–725,1 эВ, а также небольшой сателлитный пик между ними. Положения основных пиков хорошо согласуются с фазой Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> [213, 214]. Пик Fe2p<sub>3/2</sub> был разложен на пять четко установленных компонентов  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, расположенных при 709,8, 710,8, 711,8, 713,0 и 714,2 эВ (таблица 5) [212]. Кроме того, сателлитный пик Fe(III) в области 718,3-719,6 эВ также является характерной особенностью фазы Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> [213, 215].

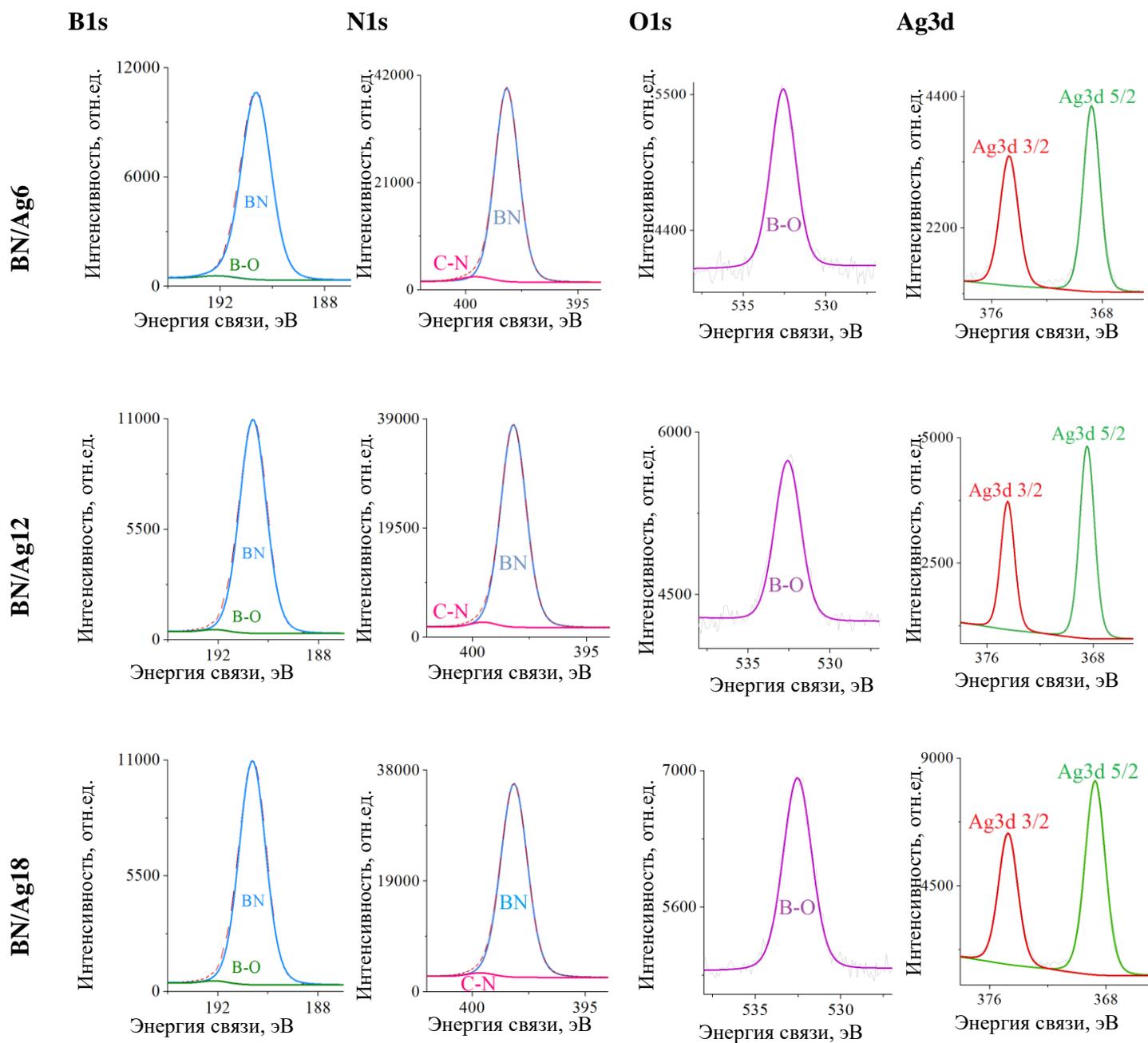


Рисунок 8 –РФЭС спектры по B1s, N1s, O1s и Ag3d покрытий BN/Ag6, BN/Ag12, BN/Ag18

Нельзя полностью исключить наличие смеси различных полиморфных модификаций  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ , о чем свидетельствует анализ ПЭМ изображений (рисунок 76) и доступная литература, так,  $\epsilon\text{-Fe}_2\text{O}_3$  обычно присутствует в смеси различных фаз оксида железа.

Таблица 5 – Доли различных сред, оцененные с помощью подбора кривой РФЭС

образец	энергия связи, эВ						
	190.85		398.45	399.37	532.52	368.74	374.77
	концентрация, %						
	B1s		N1s		O1s	Ag3d	
BN	B-O	BN	C-N	B-O	Ag3d 5/2	Ag3d 3/2	
BN/Ag6	98.81	1.19	95.66	4.34	100	61.01	38.99
BN/Ag12	98.53	1.47	97.51	2.49	100	56.76	43.24
BN/Ag18	98.46	1.54	97.93	2.07	100	60.73	39.27

	Энергия связи, эВ												
	190.6		398.2	399.4	532.5	530.4	709.8	710.8	711.8	713	714.2	719.3	725.0
	концентрация, %												
	B1s		N1s		O1s		Fe2p						
B-N	B-O	N-B	N-C	O-B	O-Fe	$\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (Fe2p 3/2)					Satellite	Fe2p 1/2	
BN/Fe30	95.26	2.74	97.93	2.07	69.57	30.43	11.87	11.35	12.51	10.42	11.58	14.35	27.92
BN/Fe50	92.69	7.31	97.62	2.38	69.07	30.93	11.98	11.72	12.21	10.92	11.64	11.82	29.71
BN/Fe150	91.44	8.56	94.61	5.39	55.37	44.63	12.83	12.33	13.21	9.15	10.71	12.84	28.93

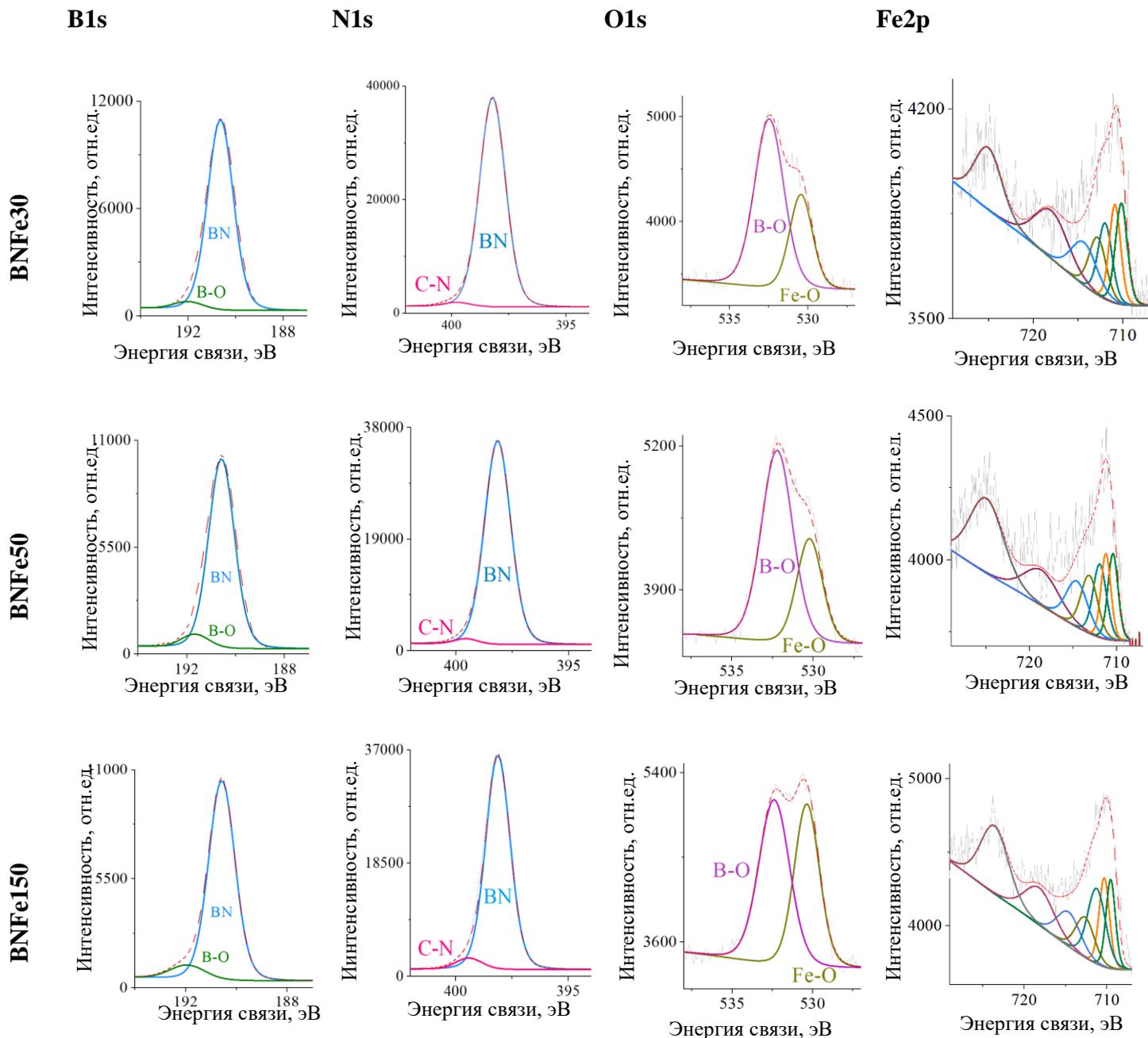


Рисунок 9 – РФЭС-спектры по B1s, N1s, O1s и Fe2p покрытий BN/Fe30, BN/Fe50, BN/Fe150

### 3.2.2 Изучение выхода бактерицидных ионов

На рисунке 10 показано количество ионов Ag и Fe, вымываемых с поверхностей покрытий *h*-BN в фосфатно-солевой буферный раствор. В целом высвобождение протекает по одинаковому сценарию, напрямую зависящему от концентрации ионов на поверхности. Спустя 24 ч из поверхности BN/Ag6, BN/Ag12 и BN/Ag18 высвободилось

3.47(57.8%), 7.26(60.5%) и 10.98(61%) мкг соответственно. В случае покрытий BN/Fe30, BN/Fe50 и BN/Fe150 через 24 ч выдержки высвободилось 19.89(66,3%), 29.87(59,7%) и 56.78(37,8%) мкг соответственно. Можно отметить, что как в случае ионов Ag, так и Fe, с увеличением концентрации интенсивность высвобождения замедляется, относительно общего %. Во всех случаях быстрое увеличение концентрации Ag и Fe в первые 3 ч сопровождается более медленным выделением ионов Ag и Fe.

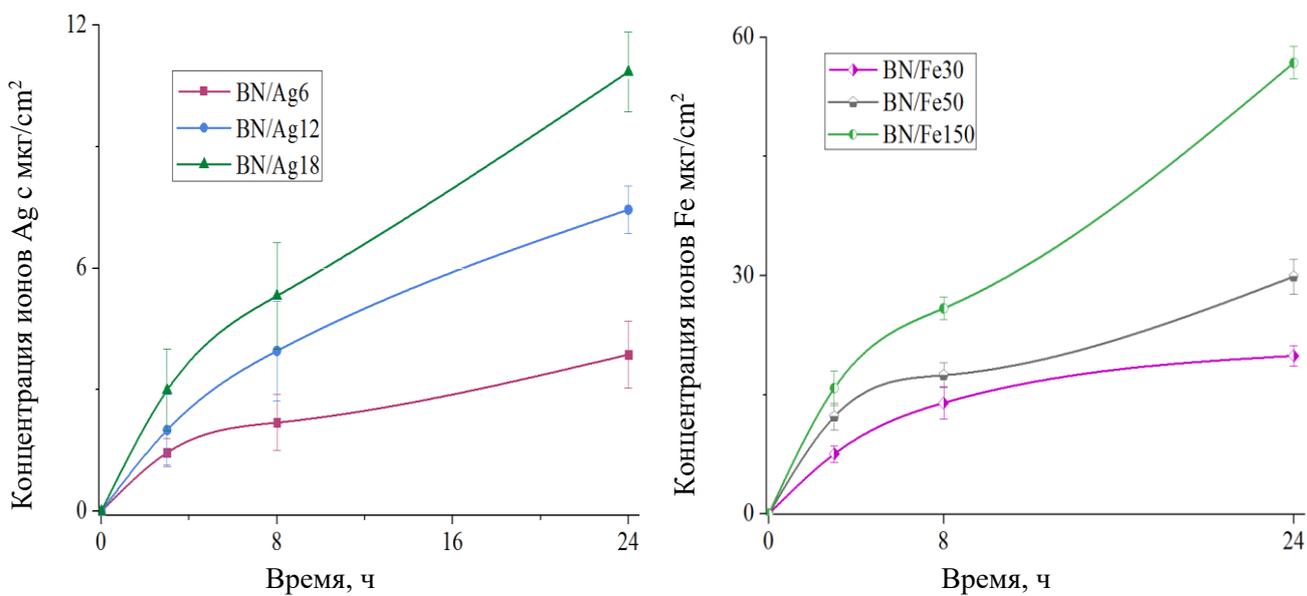


Рисунок 10 – Выход ионов с поверхности покрытий

### 3.2.3 Исследование влияния осаждения частиц *Me* на смачиваемость покрытий

Смачиваемость покрытий *h*-BN каплей воды показана на рисунках 11, 12. Поверхность покрытий без наночастиц гидрофобна; угол контакта с водой составляет 134,1°. Осаждение НЧ Ag улучшает смачиваемость. По мере увеличения содержания Ag краевой угол смачивания водой постепенно уменьшается от 130,6° (BN/Ag6) до 90,1° (BN/Ag100), но пленки остаются гидрофобными. В случае пленок BN, декорированных НЧ Fe, краевой угол смачивания водой уменьшается от 121,2° (BN/Fe30) до 57,1° (BN/Fe700), а при содержании Fe более 300 мг/см<sup>2</sup> пленки становятся гидрофильными. Смачиваемость поверхности играет важную роль в адсорбции клеток и белков на поверхности биоматериала. Улучшенная смачиваемость способствует адгезии и пролиферации клеток остеобластов, снижает адгезию тромбоцитов и вероятность тромбоза в сосудистой системе [217].

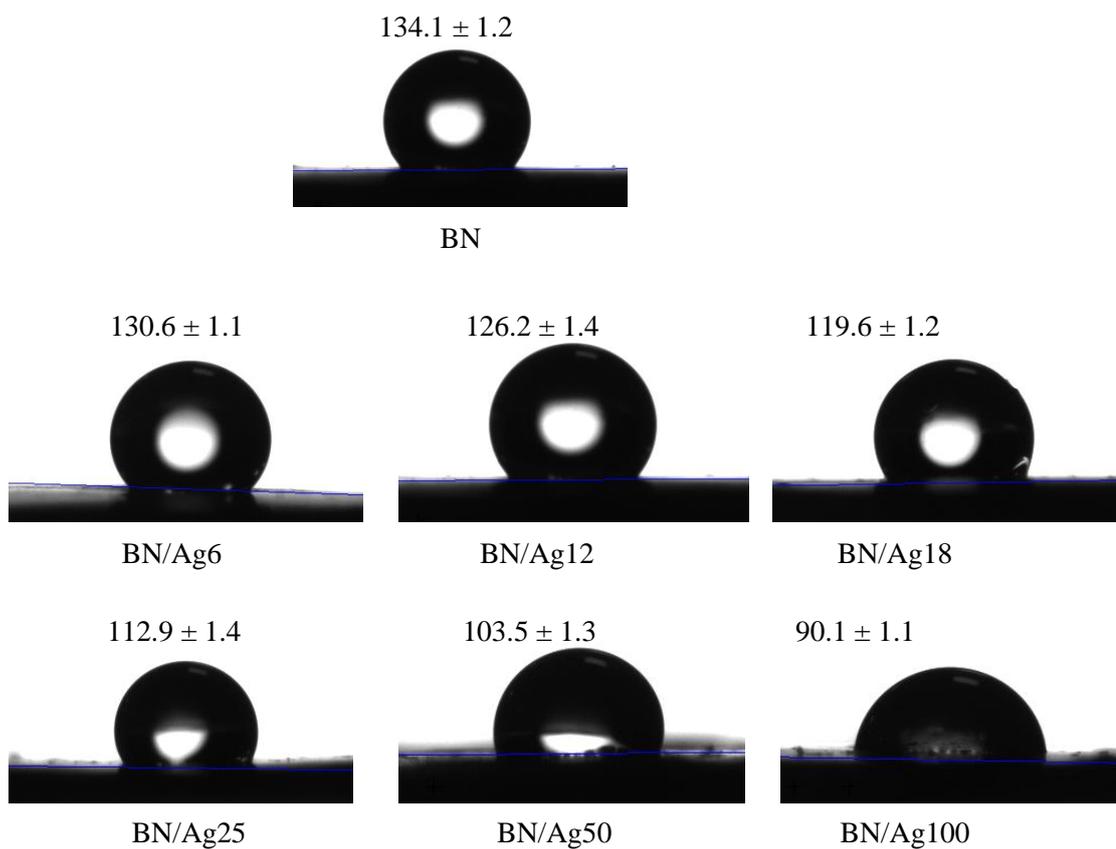


Рисунок 11 – Контактный угол смачивания покрытий BN/Ag

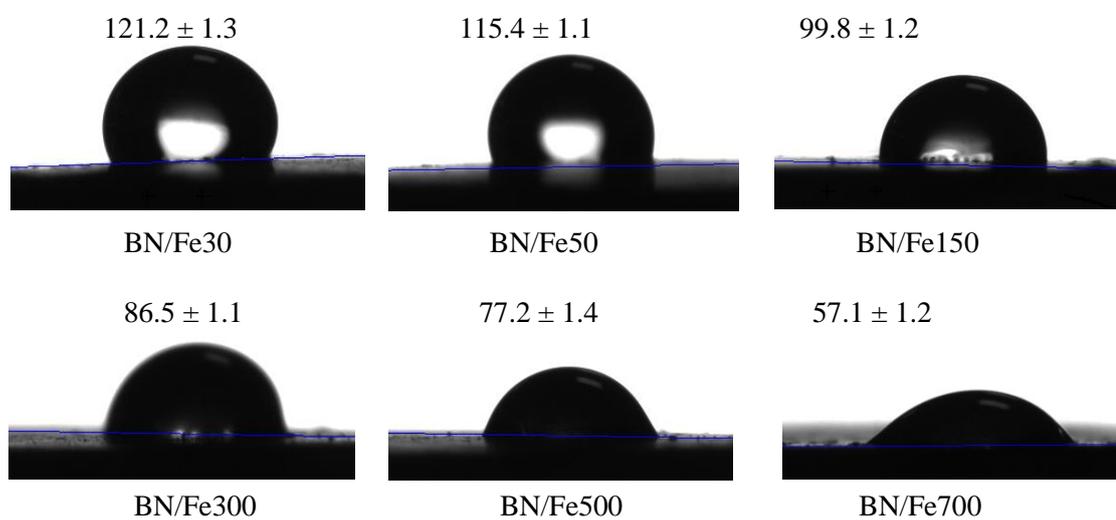


Рисунок 12 – Контактный угол смачивания покрытий BN/Fe

### 3.3 Получение покрытий *h*-BN/антибиотики

#### 3.3.1 Исследование поверхностей методами РФЭС, ИК-Фурье спектроскопии

Элементный состав наноструктурированных покрытий BN до и после обработки антибиотиками, определенные с помощью РФЭС, представлены в таблице 6. После обработки антибиотиками поверхность BN окислялась (рисунок 13). Фракции различных сред В, С и N, оцененные с помощью РФЭС анализа, показаны в таблице 7. По сравнению с РФЭС спектром В1s исходного BN в образце G<sub>300</sub>/BN наблюдаются два дополнительных компонента при 192,2 эВ (ВО) и 194,4 эВ (В(ОН)<sub>3</sub>). В образце A<sub>20</sub>/BN идентифицирован только пик В-О/ВНО низкой интенсивности, что указывает на то, что он менее окислен из-за более низкой нагрузочной дозы амфотерицина В. В случае образца G<sub>300</sub>-A<sub>100</sub>/BN связывания BN не наблюдается из-за полного окисления поверхности BN. Спектр РФЭС С1s образца G<sub>300</sub>/BN был разделен на три компонента: амидная группа NC=O (BE = 288,9 эВ), СО/CN (BE = 286,6 эВ) и алкильная группа С-Н<sub>х</sub> (BE = 288,9 эВ), каждая из которых входит в состав гентамицина. Кроме того, РФЭС-спектр S2р показывает присутствие серы в форме 2-сульфата SO<sub>4</sub> (BE = 168,8 эВ). Наличие аминогруппы NH<sub>3</sub><sup>+</sup> (BE = 402,5 эВ) в спектрах РФЭС N1s образцов G<sub>300</sub>/BN и G<sub>300</sub>-A<sub>100</sub>/BN свидетельствует о том, что гентамицин находится в протонированной форме. Спектр РФЭС С1s образца A<sub>20</sub>/BN был аппроксимирован следующими группами: С(О)О (BE = 290,3 эВ), NC=O (BE = 288,9 эВ), С-О/CN (BE = 286,6 эВ), и С-Н<sub>х</sub> (BE = 285,0 эВ), связи, входящие в состав амфотерицина В. Спектр РФЭС С1s образца G<sub>300</sub>-A<sub>100</sub>/BN содержит пики, принадлежащие компонентам, входящим в состав обоих антибиотиков: С(О)О (BE = 289,2 эВ) и С=О (BE = 287,6 эВ) – амфотерицин В, а С-О (BE = 286,6 эВ), С-Н (BE = 285,0 эВ) и С=С (BE = 284,35 эВ) – амфотерицин В и гентамицин. Ненасыщенный углерод С=С в избытке присутствует в структуре амфотерицина В, но поскольку этот вклад С=С принадлежит линейному ненасыщенному углероду, сателлиты встряски не наблюдаются. Таким образом, результаты РФЭС ясно показывают, что оба типа антибиотиков были успешно нанесены на пленки BN.

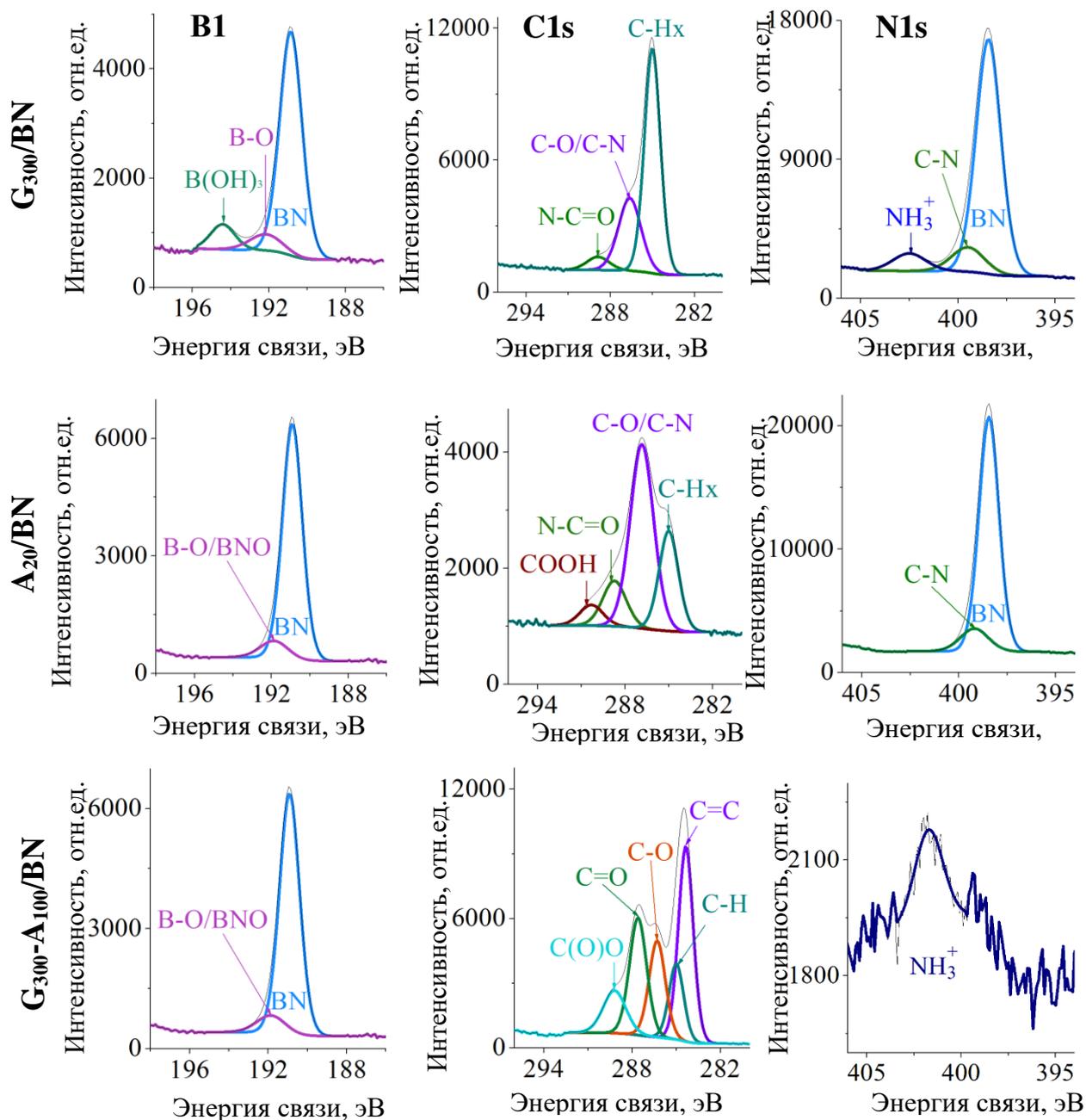


Рисунок 13 – РФЭС-спектры покрытий G<sub>300</sub>/BN, A<sub>20</sub>/BN и G<sub>300</sub>-A<sub>100</sub>/BN

Таблица 6 – Атомный состав образцов по данным РФЭС

образец	концентрация, ат. %				
	B	C	N	O	S
BN	40.4	5.7	50.7	3.2	-
Gent <sub>300</sub> /BN	25.6	23.2	34.7	15.7	0.8
Amp <sub>20</sub> /BN	24.4	37.0	26.7	11.9	-
Gent <sub>300</sub> -Amp <sub>100</sub> /BN	0.6	75.4	1.9	22.1	-
Amp <sub>20</sub> /BN 48 h	37.2	17.6	38.1	7.1	-
Gent <sub>300</sub> -Amp <sub>20</sub> /BN 48 h	32.2	24.2	34.0	9.6	-

Таблица 7 – Доли различных сред, оцененные с помощью анализа РФЭС

образец	энергия связи, эВ						
	B1s				N1s		
	190.85	192.16	194.42	191.86	398.44	399.49	402.50
	концентрация, %						
BN	B-O	B(OH) <sub>3</sub>	B-O/BNO	BN	C-N	NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	
BN	100	-	-		100	-	-
Gent <sub>300</sub> /BN	81.45	8.60	9.94	-	80.72	11.23	8.05
Amp <sub>20</sub> /BN	90.90	-	-	9.10	87.93	12.07	-
Gent <sub>300</sub> -Amp <sub>20</sub> /BN	-	100.0	-	-	-	-	100.0
Amp <sub>20</sub> /BN 48 h	100.0	-	-	-	90.95	9.05	-
Gent <sub>300</sub> -Amp <sub>20</sub> /BN 48 h	100.0	-	-	-	93.19	6.81	-
	энергия связи, эВ						
	C1s						
	284.35	285.00	286.61	287.59	288.88	289.19	290.31
	концентрация, %						
C=C	C-H	C-O/C-N	C=O	N-C=O	C(O)O	COOH	
BN	-	100	-	-	-	-	
Gent <sub>300</sub> /BN	-	64.95	29.68	-	5.37	-	
Amp <sub>20</sub> /BN	-	24.82	55.31	-	13.65	6.22	
Gent <sub>300</sub> -Amp <sub>20</sub> /BN	33.58	13.05	18.43	23.65	-	11.28	
Amp <sub>20</sub> /BN 48 h	-	45.23	40.92	-	-	13.85	
Gent <sub>300</sub> -Amp <sub>20</sub> /BN 48 h	-	59.15	35.13	-	6.72	-	

На рисунке 14 представлены ИК-спектры покрытий BN, загруженных антибиотиками. Со стороны низких волн в ИК-спектре образца G<sub>300</sub>/BN обнаруживаются три характерные полосы поглощения при 1180 см<sup>-1</sup>, соответствующие валентным колебаниям молекул C–O–C, при 1550 см<sup>-1</sup>, обусловленные деформационными колебаниями NH<sub>3</sub><sup>+</sup> и при 1650 см<sup>-1</sup> (C=O). Широкий максимум поглощения в области 2850 - 3050 см<sup>-1</sup> относится к колебаниям связи C-H. ИК-спектр образца A<sub>20</sub>/BN содержит полосы поглощения при 1470 см<sup>-1</sup> (валентное колебание C=C), 1600 см<sup>-1</sup> (деформационное колебание NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), 1730 см<sup>-1</sup> (валентное колебание C=O) и 2900 см<sup>-1</sup>

(вибрация растяжения СН в полиене), характерные для амфотерицина В. ИК-спектр образца G<sub>300</sub>-A<sub>100</sub>/BN представляет собой комбинацию спектров G<sub>300</sub>/BN и A<sub>20</sub>/BN. Таким образом, результаты ИК-спектроскопии дополнительно подтверждают, что пленки BN действительно были насыщены гентамицином и амфотерицином В.

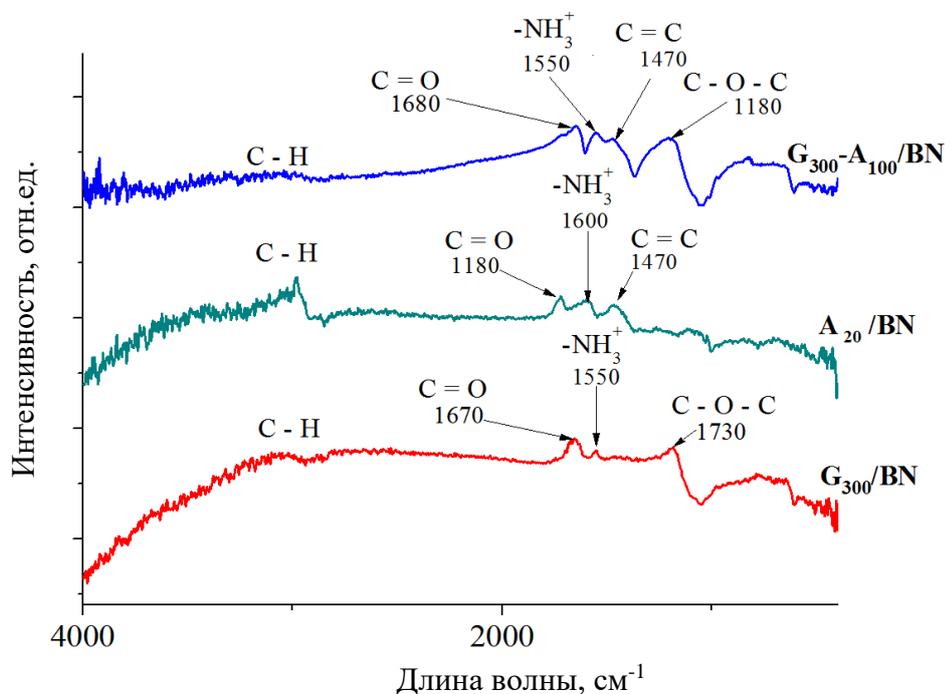


Рисунок 14 – ИК-спектры покрытий BN с антибиотиками

После воздействия физиологического раствора на образец в течение 48 часов количество антибиотика на поверхности BN уменьшилось (рисунок 15). Пики В-О полностью исчезают из-за растворения оксида бора. Интенсивность пиков в РФЭС спектрах С1s, указывающих на антибиотики, ниже по сравнению с исходными образцами. Тем не менее данные РФЭС ясно показывают, что некоторое количество гентамицина и амфотерицина В сохраняется на поверхности образцов после выдержки в физиологическом растворе в течение 48 ч.

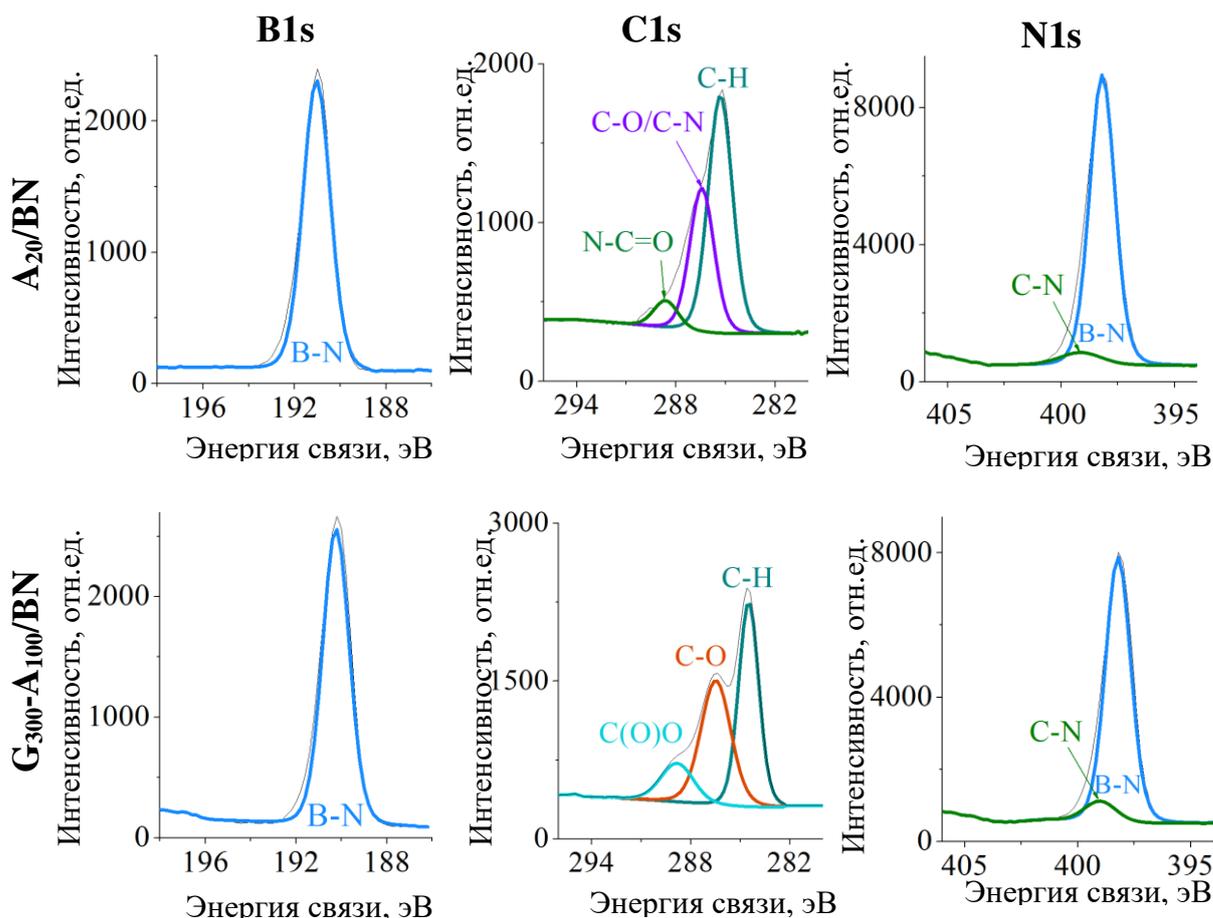


Рисунок 15 – РФЭС спектры покрытий  $A_{20}/BN$  и  $G_{300}-A_{100}/BN$  после вдержки в физиологическом растворе в течение 48 ч

### 3.3.2 Изучение выхода антибиотиков

На рисунке 16 показана кинетика высвобождения антибиотика из покрытий BN в фосфатно-солевой буферный раствор с течением времени. Количество антибиотика, вымываемого с поверхности образца в единицу времени, зависит от нагрузочной дозы: чем выше доза, тем больше количество препарата. Несмотря на разную концентрацию антибиотика, все образцы демонстрируют схожую кинетику высвобождения лекарственного средства, которую можно описать двумя последовательными стадиями, связанными с быстрым растворением поверхностно-связанного лекарственного средства и замедленным высвобождением, контролируемым инкорпорированным лекарственным средством. Скорость высвобождения гентамицина увеличивается с нагрузочной дозой. За первые 24 ч количество высвобожденного гентамицина увеличивается с 55 ( $G_{150}/BN$ ) до 164 мкг/мл ( $G_{300}/BN$ ), что составляет 36,3 и 54,6% нагрузочной дозы соответственно. Через 24 ч кумулятивное количество амфотерицина В составляет 28 мкг/мл (28% нагрузочной дозы). Эта стадия связана с растворением поверхностно-связанного лекарства. Далее концентрация антибиотика со временем постепенно увеличивается за

счет его высвобождения изнутри покрытия BN. В конце второй стадии, продолжительность которой зависит от нагрузочной дозы терапевтического агента, практически весь антибиотик, загруженный в BN, высвобождается в фосфатно-солевой буферный раствор. Максимальные концентрации гентамицина составляют 285 (G<sub>300</sub>/BN, 11 дней) и 142 мкг/мл (G<sub>150</sub>/BN, 9 дней). В случае амфотерицина В (образец A<sub>100</sub>/BN) высвобождение антибиотика наблюдалось в течение 11 дней, что привело к максимальной концентрации 93 мкг/мл. Описанные выше результаты ясно показывают, что наноструктурированные покрытия BN обладают высокой емкостной загрузкой антибиотиков и способны высвобождать антибактериальные и противогрибковые агенты в течение длительного времени. Важно отметить, что пропитанные антибиотиками покрытия BN демонстрируют быстрое начальное и устойчивое высвобождение лекарственного средства. Пролонгированное высвобождение требует хорошей смачиваемости поверхности и проникновения смачиваемой жидкости в структуру покрытия BN. Для сравнения количество терапевтического агента, высвобождаемого из образцов A<sub>100</sub>/BN и G<sub>150</sub>/BN, определяли методом жидкостной хроматографии (рисунок 16б). Этот метод показывает кинетику высвобождения лекарственного средства, аналогичную той, которая определяется спектрофотометрией. Совокупное количество гентамицина и амфотерицина увеличивалось со временем, однако зависимость была менее линейной.

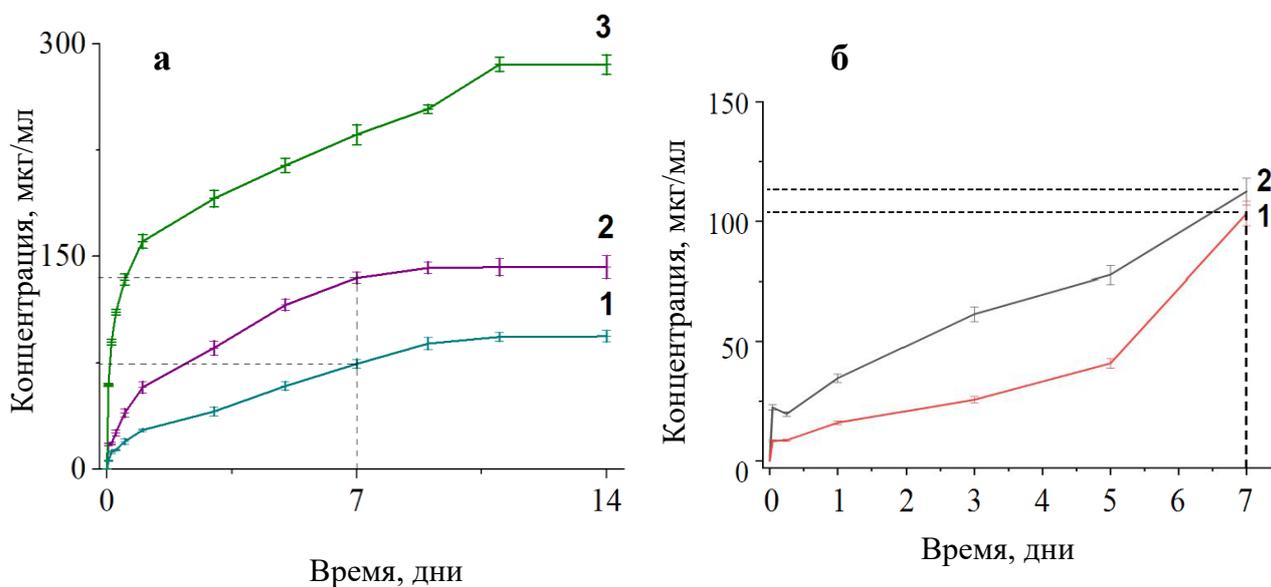


Рисунок 16 – Совокупное количество амфотерицина В (1) и гентамицина (2, 3), высвобожденных из покрытий BN при погружении в раствор PBS при 25 °С (pH 7.4) в течение 14 дней (а) и 7 дней (б), определенным спектрофотометрическим методом (а) и методом жидкостной хроматографии (б) (1) A<sub>100</sub>/BN, (2) G<sub>150</sub>/BN, (3) G<sub>300</sub>/BN

### 3.3.3 Исследование влияния пришивки антибиотиков на смачиваемость покрытий

На рисунке 17 приведены результаты исследований влияния иммобилизации антибиотиков на смачиваемость покрытий BN. Не обработанная поверхность BN после синтеза обладает высокой гидрофобностью, о чем свидетельствует высокое значение КУС  $133,4^\circ \pm 1,3^\circ$ . Нанесение гентамицина незначительно улучшает смачиваемость поверхности. В зависимости от нагрузочной дозы антибиотика КУС снижается со  $105,8$  ( $150 \text{ мкг/см}^2$ ) до  $81,7$  ( $300 \text{ мкг/см}^2$ ).

Все образцы, пропитанные амфотерицином В, демонстрируют повышенную смачиваемость поверхности. Значения КУС становятся такими низкими, как  $7,3^\circ$  ( $A_{100}/BN$ ),  $18,2^\circ$  ( $G_{150}-A_{100}/BN$ ) и  $6,9^\circ$  ( $G_{300}-A_{100}/BN$ ). Во многих исследованиях сообщалось, что иммобилизация антибиотиков снижает значения КУС [220, 221]. Наши результаты показывают, что степень улучшения смачиваемости зависит от типа антибиотика. Поскольку амфотерицин В имеет одиннадцать гидрофильных групп ( $NH_2-1$ ,  $COOH-1$ ,  $OH-9$ ) по сравнению с шестью у гентамицина ( $NH_2-4$ ,  $OH-2$ ), его нагрузка значительно улучшает смачиваемость.

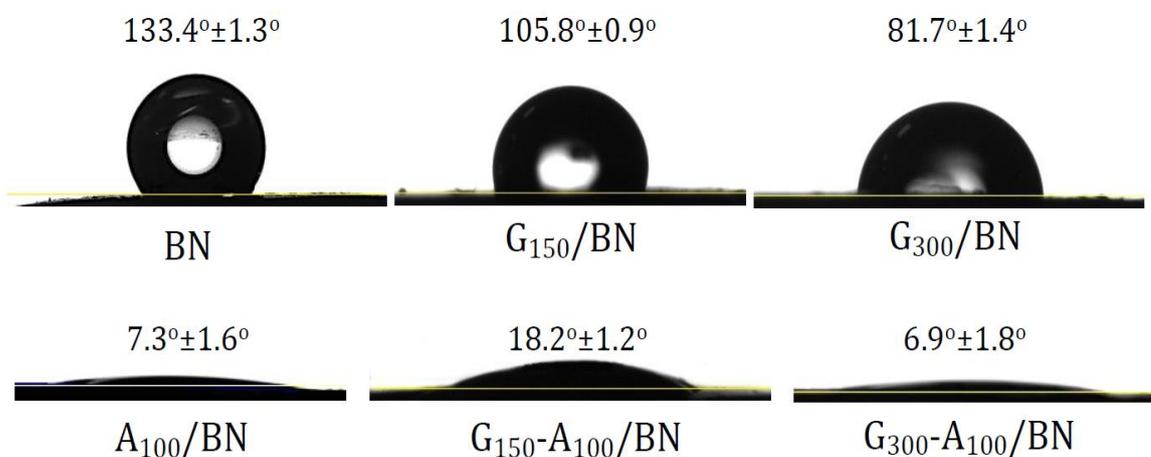


Рисунок 17 – Смачиваемость поверхностей и величины краевого угла смачивания покрытий BN

## ГЛАВА 4. Разработка наночастиц в системе *h*-BN/*Me*/антибиотики

### 4.1 Синтез и анализ наночастиц на основе *h*-BN

Синтезированные НЧ BN были проанализированы с использованием СЭМ (рисунок 18а) и ПЭМ (рисунок 18б). ЭДС-анализ подтвердил, что наночастицы, состоят из В и N, а также было зафиксировано небольшое количество кислорода. Как следует из рисунка 18в, размер НЧ BN находится в диапазоне 60–120 нм, при этом большая часть НЧ (>65%) имеет размер 90–100 нм. Наночастицы имеют ряд преимуществ перед микрочастицами, поскольку обладают повышенной способностью сорбировать антибиотики за счет большей удельной поверхности, проницаемости сосудов и способности преодолевать гематоэнцефалический барьер, обеспечивая непрерывную доставку лекарств [222]. Например, НЧ с размер 100 нм обладает в 2,5 и 6 раз большей сорбционной способностью к антибиотикам по сравнению с микрочастицами диаметром 1 и 10 мкм соответственно [223].

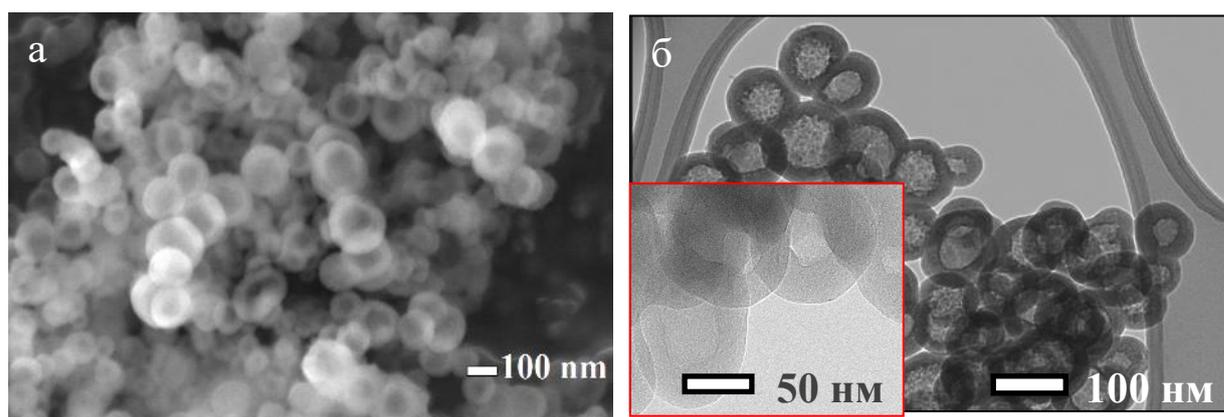


Рисунок 18 – СЭМ (а) и ПЭМ (б) микрофотографии, гистограмма распределения по размеру (в) НЧ BN

На рисунке 19 показан ИК-спектр наночастиц BN. Два пика высокой интенсивности, которые могут быть приписаны вне плоскостным изгибным колебаниям В-N-В ( $780\text{ см}^{-1}$ ) и плоскостным растягивающим колебаниям В-N ( $1370\text{ см}^{-1}$ ) [224]. Небольшой пик при  $520\text{ см}^{-1}$  соответствует  $\text{В}_2\text{О}_3$  и связям О-В-О.

Рентгенограммы НЧ BN представлены на рисунке 19. В образце BN, кроме основных пиков от кристаллографических плоскостей *h*-BN (002), (100), (101) и (004) (карта ICDD № 00-034-0421), присутствуют дополнительные максимумы, соответствующие фазам BNO (карта ICDD № 00-37-1234) и  $\text{В}_2\text{О}_3$  (карта ICDD № 00-06-0297). Небольшой сдвиг положения пиков связан с несколько большими параметрами элементарной ячейки из-за присутствия в структурах небольшого количества кислорода, что согласуется с результатами ИК-спектроскопии и ЭДС-анализа.

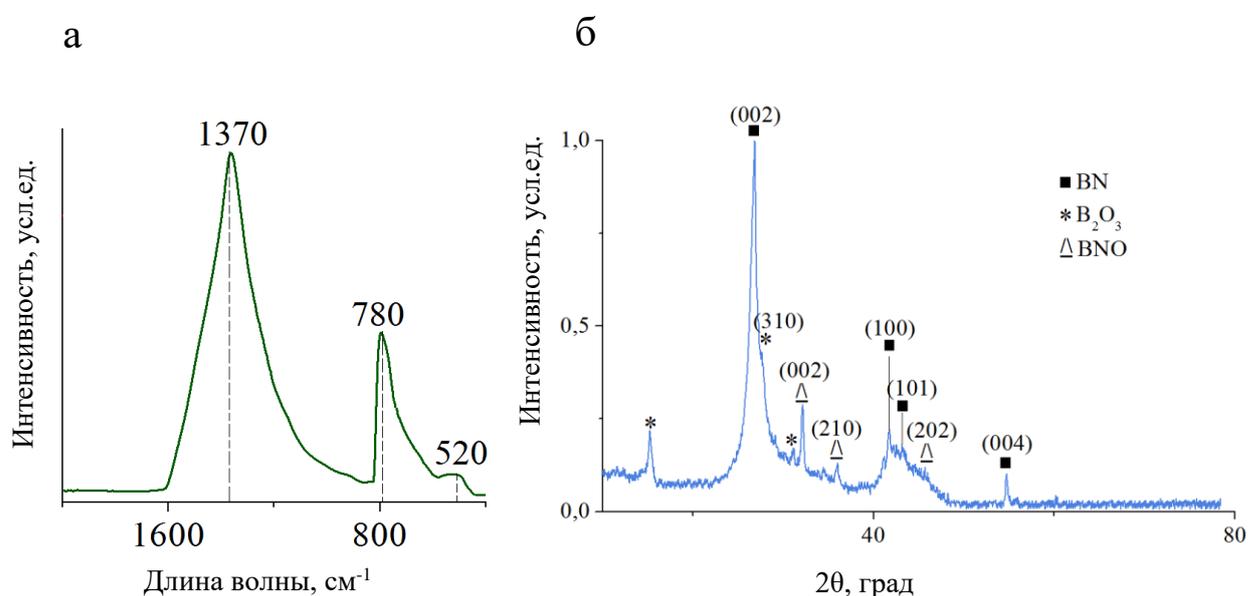


Рисунок 19 – ИК-спектр (а) и рентгенограмма (б) НЧ BN

Стабильность суспензий НЧ BN в воде в течение времени продемонстрирована на рисунке 20. В период 24 ч частицы относительно стабильны, тогда к 48 ч видны изменения в плотности суспензии.

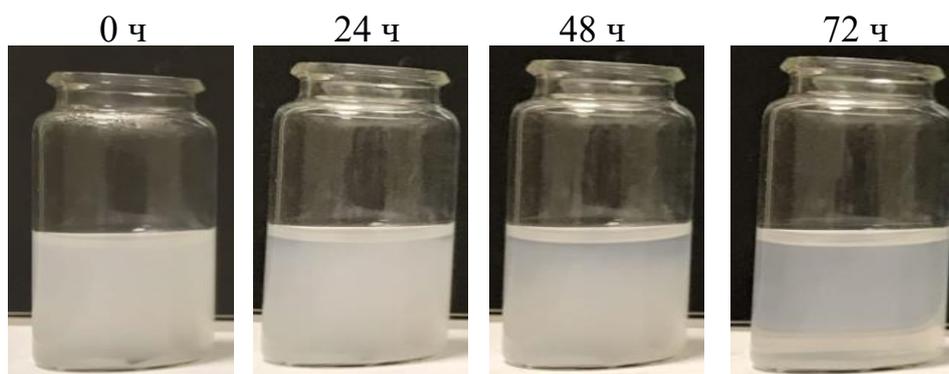


Рисунок 20 – Стабильность НЧ BN

## 4.2 Получение и анализ наночастиц *h*-BN/Me

### 4.2.1 Исследование поверхности наночастиц методами СЭМ, ПЭМ, ИК-Фурье спектроскопии и РФА

Наногбриды BN/Ag были проанализированы с использованием СЭМ (рисунок 21а) и ПЭМ (рисунок 21б). Осаждение наночастиц Ag при ультрафиолетовом разложении  $\text{AgNO}_3$  не повлияло на размер и морфологию наночастиц BN. НЧ Ag имеют размер 3-10 нм и равномерно распределены по поверхности BN (рисунок 21в).

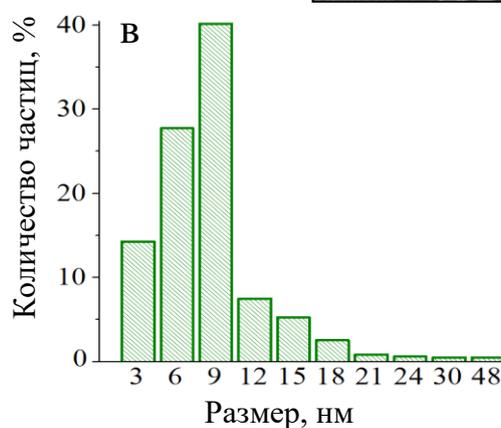
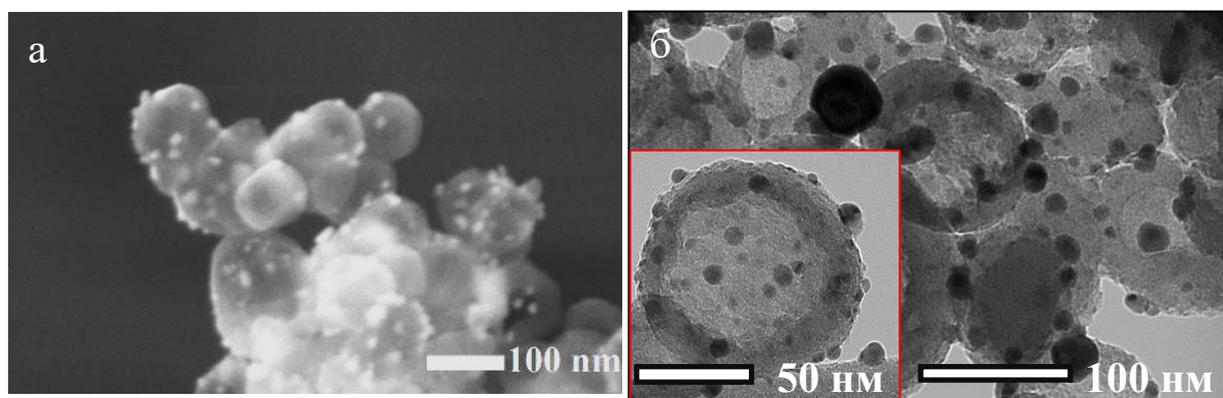


Рисунок 21 – СЭМ (а) и ПЭМ (б) микрофотографии, гистограмма распределения по размеру (в) НЧ BN/Ag

На рисунке 22а показаны ИК-спектры НЧ BN/Ag. Осаждение наночастиц Ag на поверхность *h*-BN повлияло на интенсивность пиков связей, соответствующих нитриду бора. Рентгенограммы НЧ наногридов BN/Ag представлены на рисунке 22б. В образце BN/Ag, кроме основных пиков от кристаллографических плоскостей *h*-BN, видны характерные пики (111) и (200) Ag (карта ICDD № 00-04-0783).

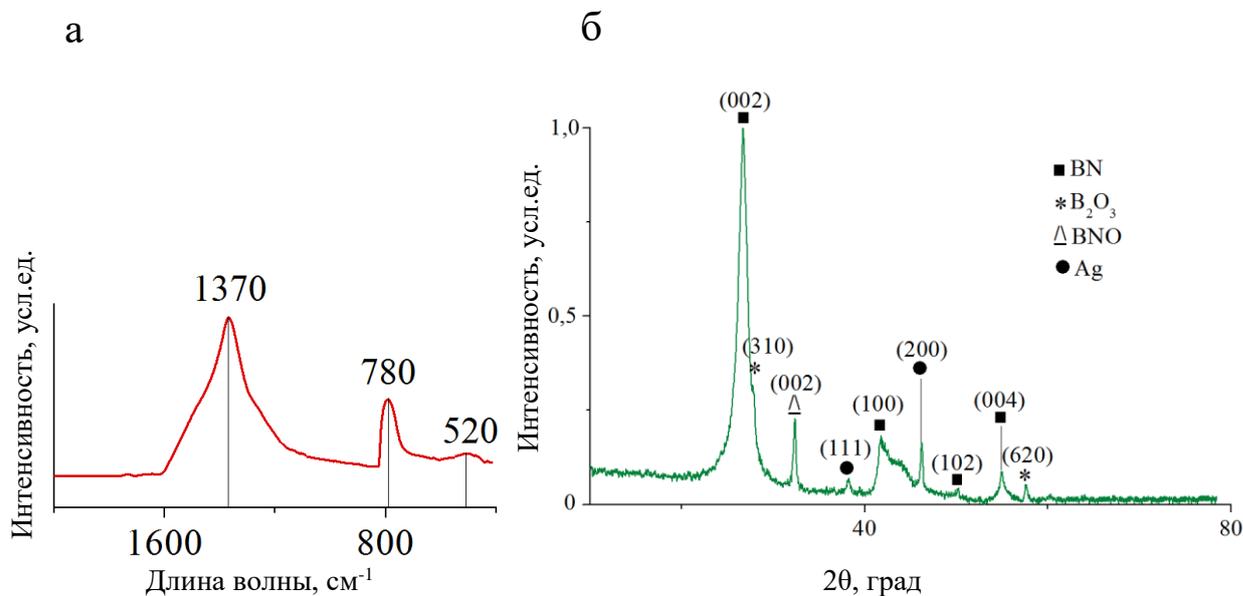


Рисунок 22 – ИК-спектр (а) и рентгенограмма (б) НЧ BN/Ag

#### 4.2.2 Изучение стабильности и выхода бактерицидных ионов

На рисунке 23 показано количество ионов Ag, вымываемых с поверхностей наночастиц в фосфатно-солевой буферный раствор в зависимости от времени. Наиболее интенсивное выделение ионов наблюдается в первые часы; через 3 ч высвобождается около 250 мкг, а в следующие 24 ч концентрация Ag достигает 370 мкг. Затем выделение ионов Ag<sup>+</sup> значительно замедлилось и в конце концов прекратилось через 5 дней.

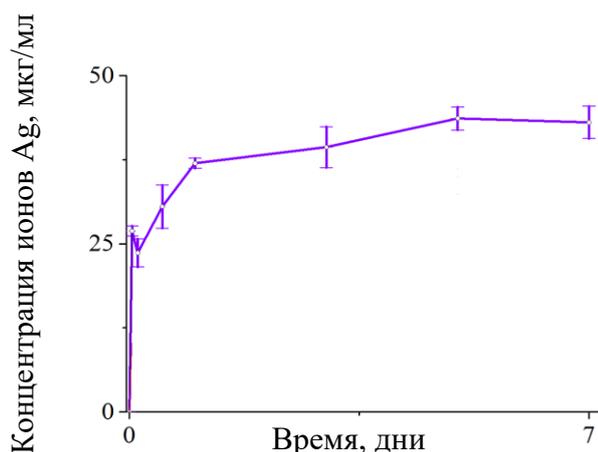


Рисунок 23 – Выход ионов Ag из НЧ BN/Ag

Стабильность суспензий НЧ BN/Ag в воде в течение времени продемонстрирована на рисунке 24. Результаты сопоставимы с данными НЧ BN, потеря стабильности наблюдается после 24 ч исследования, однако после 72 ч суспензия BN/Ag плотнее чем BN, результаты согласуются с исследованием заряда НЧ, поскольку изначально заряд частиц BN/Ag больше, чем BN.

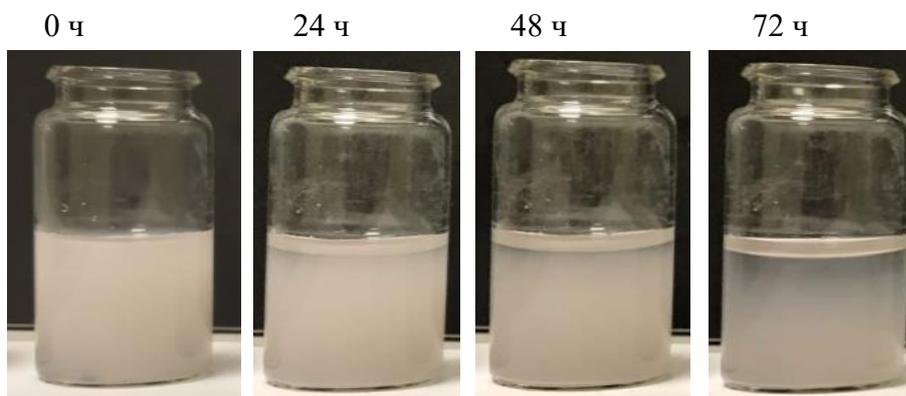


Рисунок 24 – Стабильность НЧ BN/Ag

### 4.3 Получение наночастиц *h*-BN/антибиотики

#### 4.3.1 Исследование влияния пришивки антибиотиков на размер и дзета потенциала наночастиц

Очевидно, что терапевтический эффект нагруженных антибиотиками НЧ зависит от дозы. Однако не менее важной задачей является создание устойчивых суспензий НЧ. Агломерация НЧ зависит от заряда их поверхности. Частицы, имеющие дзета-потенциал выше +30 мВ и ниже -30 мВ, считаются стабильными [225]. Таким образом, оптимальные диапазоны концентраций антибиотика были определены на основе измерений размера НЧ

BN и их поверхностного заряда при изменении концентрации гентамицина и амфотерицина В в пределах 0-20 масс. %.

Результаты исследования влияния концентрации гентамицина и амфотерицина В на дзета-потенциал и размер НЧ BN приведены на рисунке 25. В то время как значения дзета-потенциала нагруженных гентамицином НЧ BN постепенно увеличиваются с -24 мВ до -8 мВ с увеличением концентрации антибиотика (рисунок 25а), для амфотерицина В зависимость обратная: значения дзета-потенциала уменьшаются от минус 25 до минус 35 мВ (рисунок 25б). Наблюдаемые изменения поверхностного заряда можно понять, учитывая, что гентамицин заряжен положительно из-за большого количества аминогрупп. Вот почему поверхностный заряд нагруженных гентамицином наночастиц увеличивается с увеличением содержания антибиотика. Напротив, амфотерицин В имеет одну группу COOH и девять групп OH и, следовательно, заряжен отрицательно. Это хорошо объясняет снижение значений дзета-потенциала при увеличении содержания антибиотика.

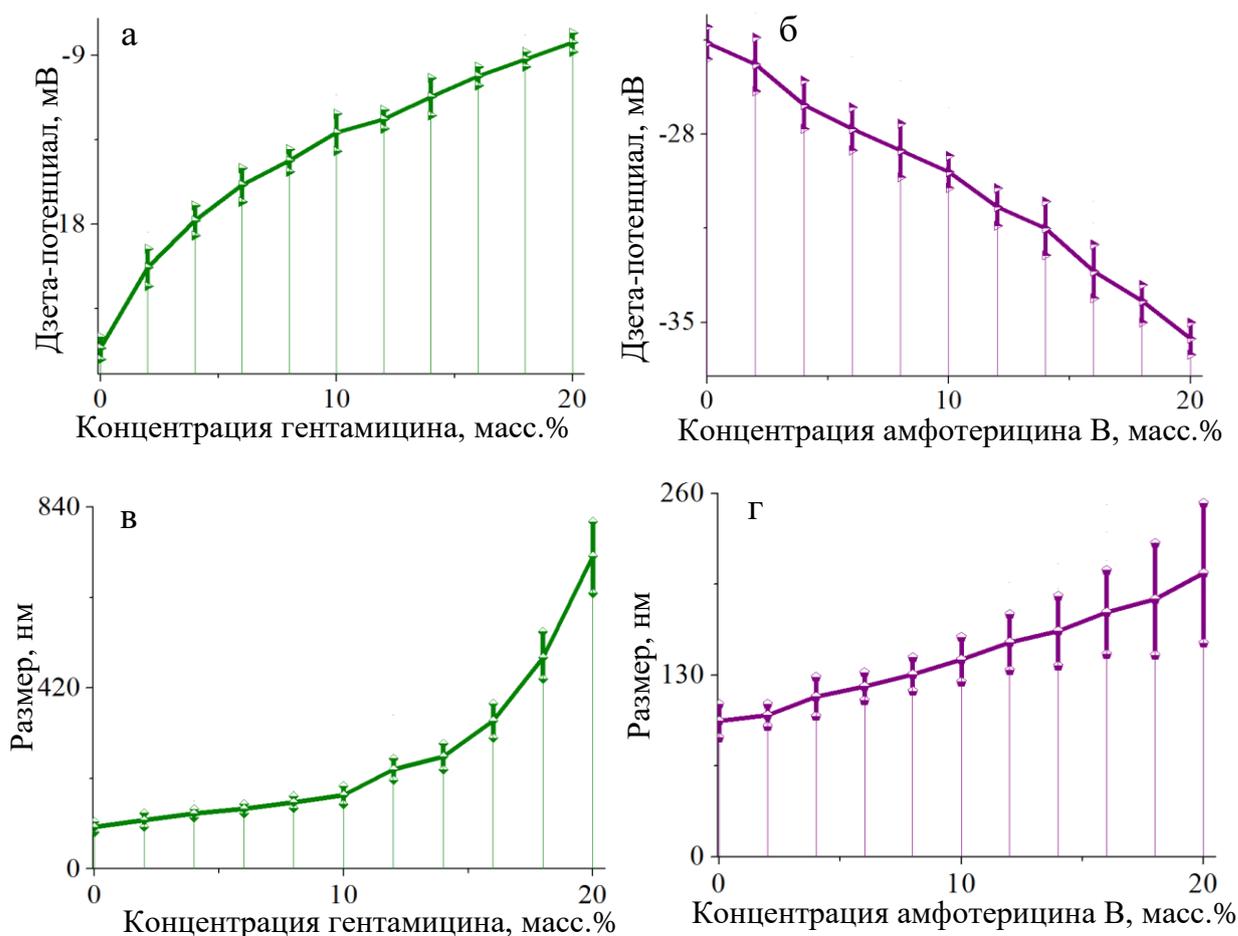


Рисунок 25 – Дзета-потенциал (а) и размер (б) НЧ BN, нагруженных гентамицином (а, в) и амфотерицином В (б, г), в зависимости от концентрации антибиотика

На рисунке 25 в, г показано, что нагруженные гентамицином НЧ VN относительно стабильны вплоть до концентрации препарата 8 масс.%; затем наблюдается быстрая агломерация наночастиц. Размер НЧ, нагруженных амфотерицином В, постепенно увеличивается с увеличением концентрации антибиотика (рисунок 25г). Дополнительными аргументами в пользу необходимости тщательного подбора концентраций антибиотиков являются эффективная бактериальная защита и требования безопасности для здоровья. Поэтому необходимо определить минимальную ингибирующую концентрацию (МИК). Наши предварительные эксперименты с 10, 12 и 16 масс. % гентамицина и 4, 6 и 8 масс. % амфотерицина В показали очень сильный бактерицидный эффект против штаммов *E. coli* и *S. aureus*. Поэтому с учетом размера частиц и значений их дзета-потенциала, а также результатов предварительных антибактериальных испытаний были выбраны следующие концентрации антибактериальных средств: 4, 6 и 8 масс.% (гентамицин) и 1, 2 и 3 масс.% (амфотерицин В).

#### **4.3.2 Исследование поверхности наночастиц методами РФЭС, ИК-Фурье спектроскопии**

НЧ VN нагруженные 4% гентамицина и 1% амфотерицина В были проанализированы с использованием РФЭС и ИК-спектроскопии. На рисунке 26 показаны ИК-спектры НЧ VN, насыщенные антибиотиками. После иммобилизации гентамицина (образец VN-G4) наблюдаются характерные полосы поглощения гентамицина при  $920\text{ см}^{-1}$ ,  $1030\text{ см}^{-1}$  и  $3200\text{ см}^{-1}$ , которые соответствуют деформационным колебаниям C – H, валентным колебаниям молекулы C – O – C и валентным колебаниям N – H соответственно. ИК-спектр образца VN-A1 содержат пики соответствующие молекуле амфотерицина В, о чем свидетельствует наличие валентных колебаний C – O, деформационных колебаний C = O и валентных колебаний C – N при  $1020\text{ см}^{-1}$ ,  $1700\text{ см}^{-1}$  и  $2900\text{ см}^{-1}$  соответственно.

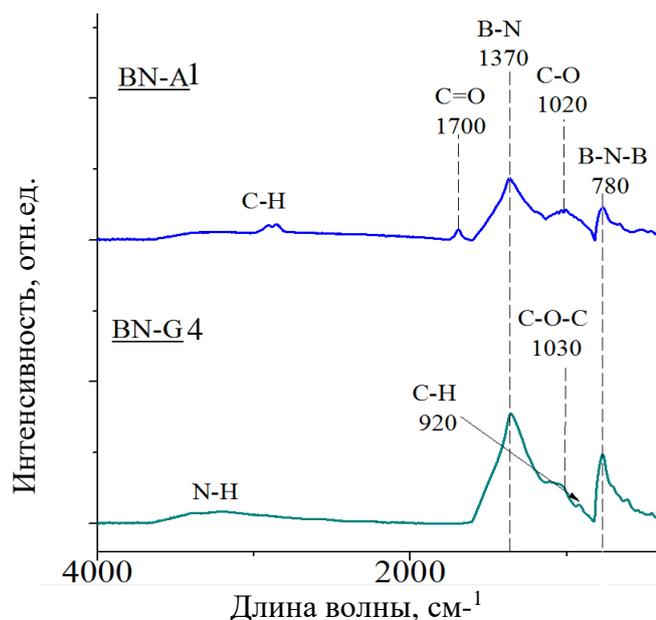


Рисунок 26 – ИК-спектры НЧ BN с антибиотиками

РФЭС-анализ был использован для определения химических связей и элементного состава загруженных антибиотиками НЧ BN. Полученные результаты представлены в таблицах 8 и 9 и рисунке 27. Помимо основного пика при 190,85 эВ, который принадлежит фазе BN, РФЭС спектры V1s показывают компоненту В – О при 192,2 эВ и небольшое количество В(OH)<sub>3</sub> (пик при 194,4 эВ в образце BN-G4). Спектр РФЭС C1s образца BN-G4 разделен на три компонента гентамицина: алкильные группы С – Н (BE = 285,0 эВ), С – О / С – N (BE = 286,61 эВ) и амид NC = O (BE = 288,74 эВ). Спектр РФЭС по N1s содержит два пика при 399,37 и 398,3 эВ, приписываемых амидной группе С – N гентамицина и BN, соответственно. РФЭС спектр C1s образца BN-A1 имеет три характерных пика, принадлежащих антибиотику амфотерицин В: амиды N – C = O (BE = 288,74 эВ), С – О / CN (BE = 286,61 эВ), алкильные группы С - Н (BE = 285,0 эВ) и пик карбоксильной группы COOH (BE = 290,31). Спектр РФЭС N1s BN-A1 деконволюционирует на две составляющие при 398,3 эВ (BN) и 399,37 эВ (C-N). Таким образом, успешная загрузка гентамицина и амфотерицина В в наночастицы BN была подтверждена анализом РФЭС и ИК-спектроскопией.

Таблица 8 – Атомный состав НЧ, полученный по данным РФЭС

образец	концентрация, ат. %			
	В	С	Н	О
BN-G4	35.1	11.6	21.3	32.0
BN-A1	35.4	10.2	18.9	35.5

Таблица 9 – Доли различных сред, оцененные с помощью подбора кривой РФЭС

образец	энергия связи, эВ								
	190.85	192.62	194.51	285.0	286.61	288.74	290.31	398.39	399.37
	концентрация, %								
	B1s			C1s				N1s	
	BN	B-O	B(OH) <sub>3</sub>	C-H	C-O/C-N	N-C=O	COOH	BN	C-N
BN-G4	40.69	51.27	8.04	57.31	34.01	8.68	-	80.24	19.76
BN-A1	40.50	59.50	-	25.55	44.0	22.78	7.67	86.48	13.52

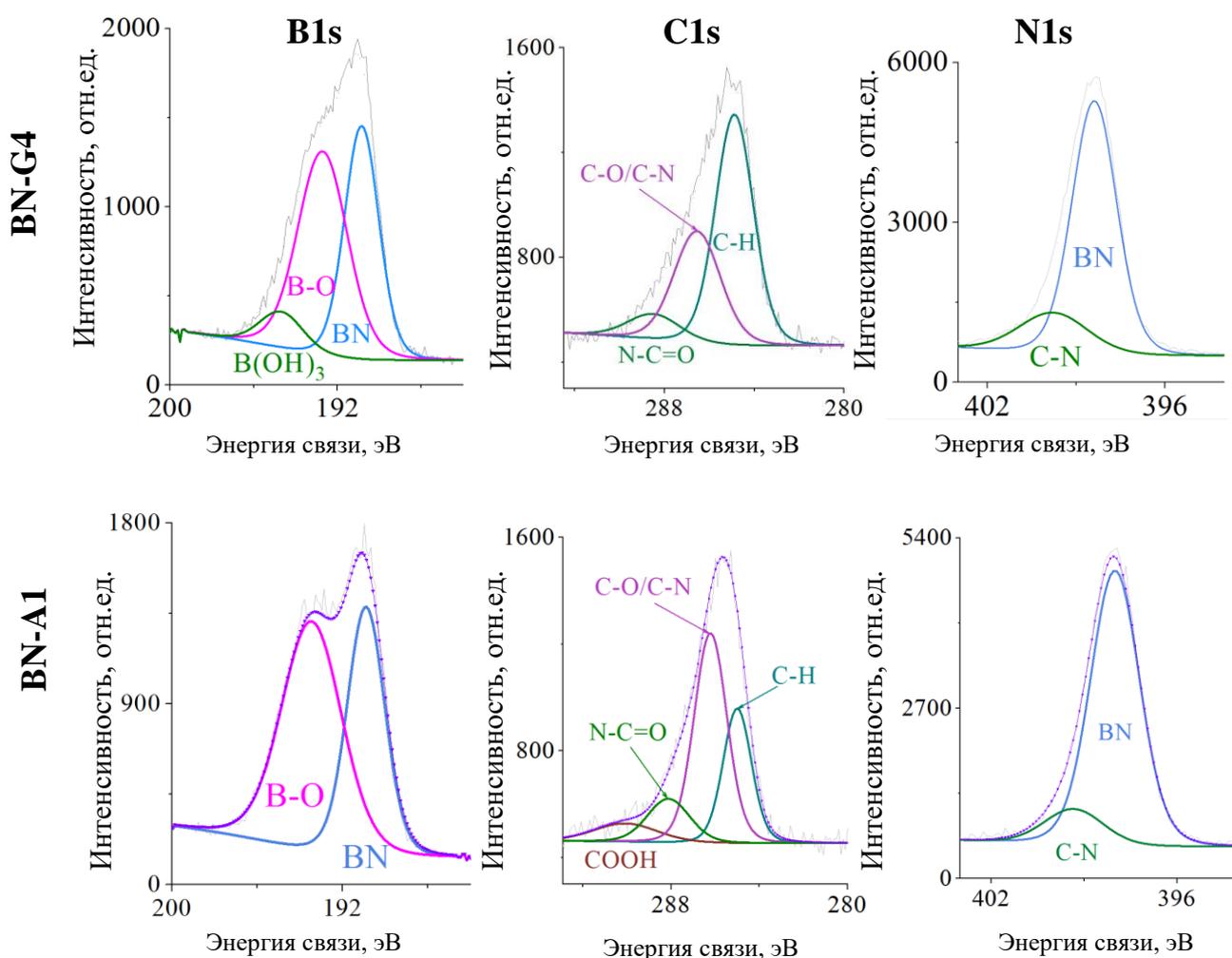


Рисунок 27 – РФЭС-спектры НЧ BN с антибиотиками

### 4.3.3 Изучение стабильности и выхода антибиотиков

На рисунке 28 показана кинетика высвобождения антибиотиков в фосфатно-солевой буферный раствор в течение 14 дней. Согласно полученным результатам количество антибиотика, выщелачиваемого из НЧ BN, зависит от дозы: чем выше нагрузочная доза, тем выше концентрация антибиотика и более длительное высвобождение лекарства. Максимальное количество гентамицина достигается через 7 дней (490 мкг/мл для BN-G4) и 9 дней (784 мкг/мл для BN-G6 и 942 мкг/мл для BN-G8).

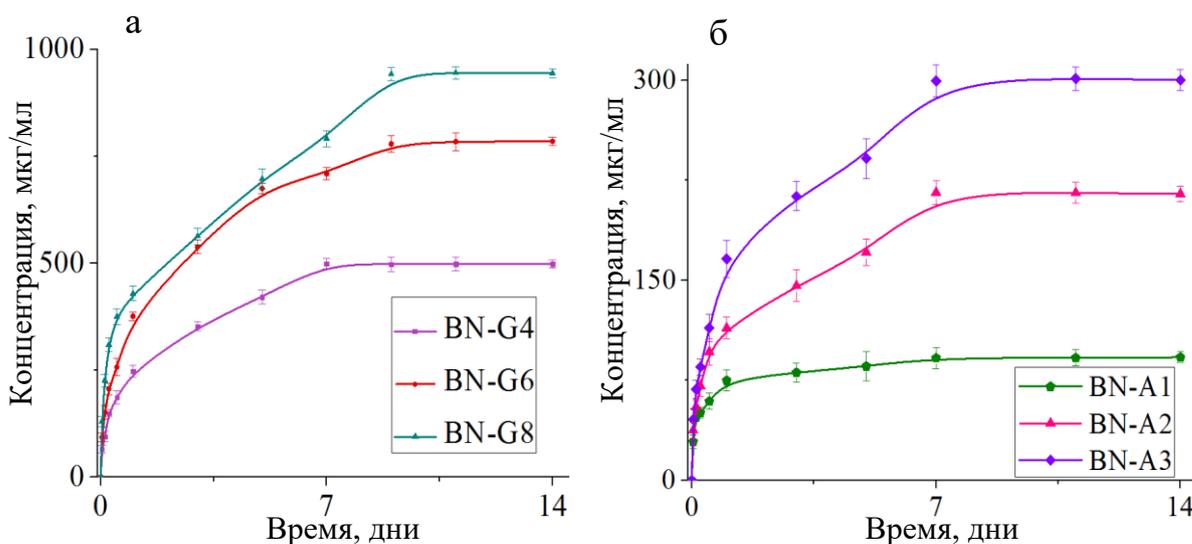


Рисунок 28 – Суммарное количество гентамицина (а) и амфотерицина В (б), выделившихся из НЧ BN при их погружении в фосфатно-солевой буферный раствор (рН 7,4) в течение 14 дней

Высвобождение препарата из образцов, нагруженных амфотерицином В, наблюдается в течение 7 дней. Максимальное кумулятивное количество амфотерицина В составляет 301 (BN-A3), 215 (BN-A2) и 91 (BN-A1) мкг/мл. В случае низкой дозы приблизительно 81% (BN-A1) загруженного антибиотика высвобождаются в течение первого дня. Характер высвобождения антибиотиков для всех образцов очень похож: начальное быстрое высвобождение в течение 1 дня, когда вымывается примерно 50% антибиотиков, и последующее устойчивое высвобождение.

Стабильность суспензий НЧ BN с антибиотиками во времени продемонстрирована на рисунке 29. Полученные результаты хорошо согласуются с данными измерения дзета-потенциала. Видно, что через 72 ч суспензии BN-G становятся более прозрачными, чем их аналоги BN-A.

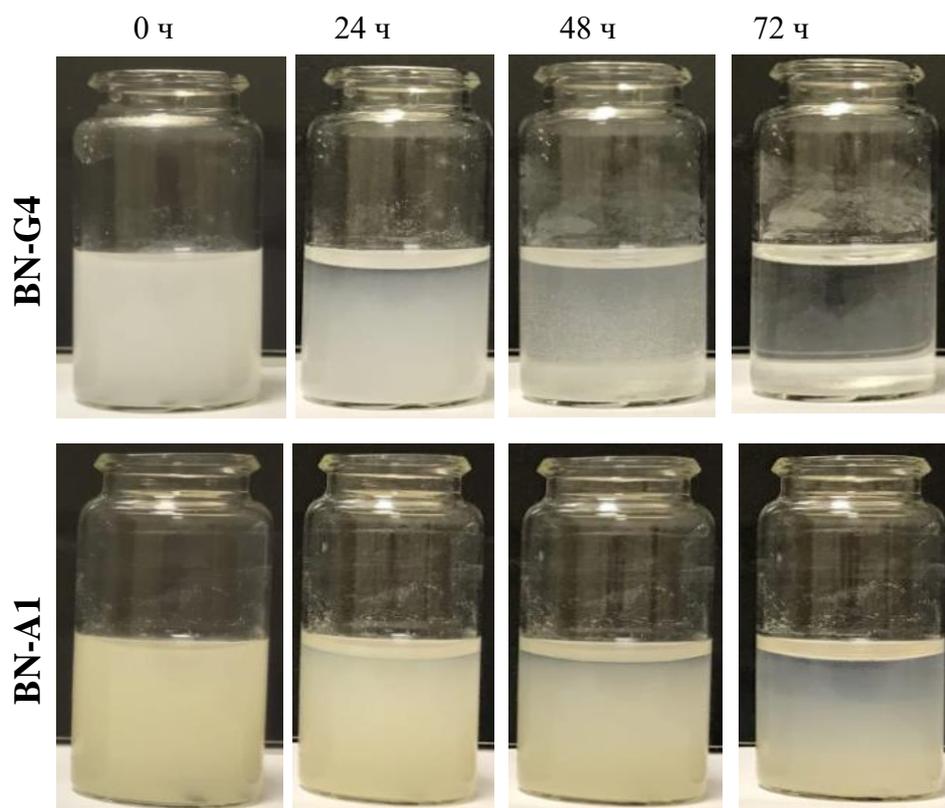


Рисунок 29 – Стабильность НЧ BN с антибиотиками

#### 4.4 Получение гибридных наночастиц *h*-BN/*Me*/антибиотики

##### 4.4.1 Исследование влияния пришивки антибиотиков на размер и дзета потенциала наночастиц

На рисунок 30 показаны результаты исследования влияния пришивки антибиотиков на размер и дзета потенциала НЧ BN/Ag. Характер изменения стабильности сопоставимы с результатами НЧ BN - относительная стабильность до концентрации препарата 8 масс.%, далее быстрая агломерация. Так с учетом размера частиц и их дзета-потенциалов, а также результатов предварительных антибактериальных испытаний были выбраны следующие концентрации антибактериальных средств: 4, 6 и 8 масс.% (гентамицин) и 1, 2 и 3 масс. масс.% (амфотерицин В).

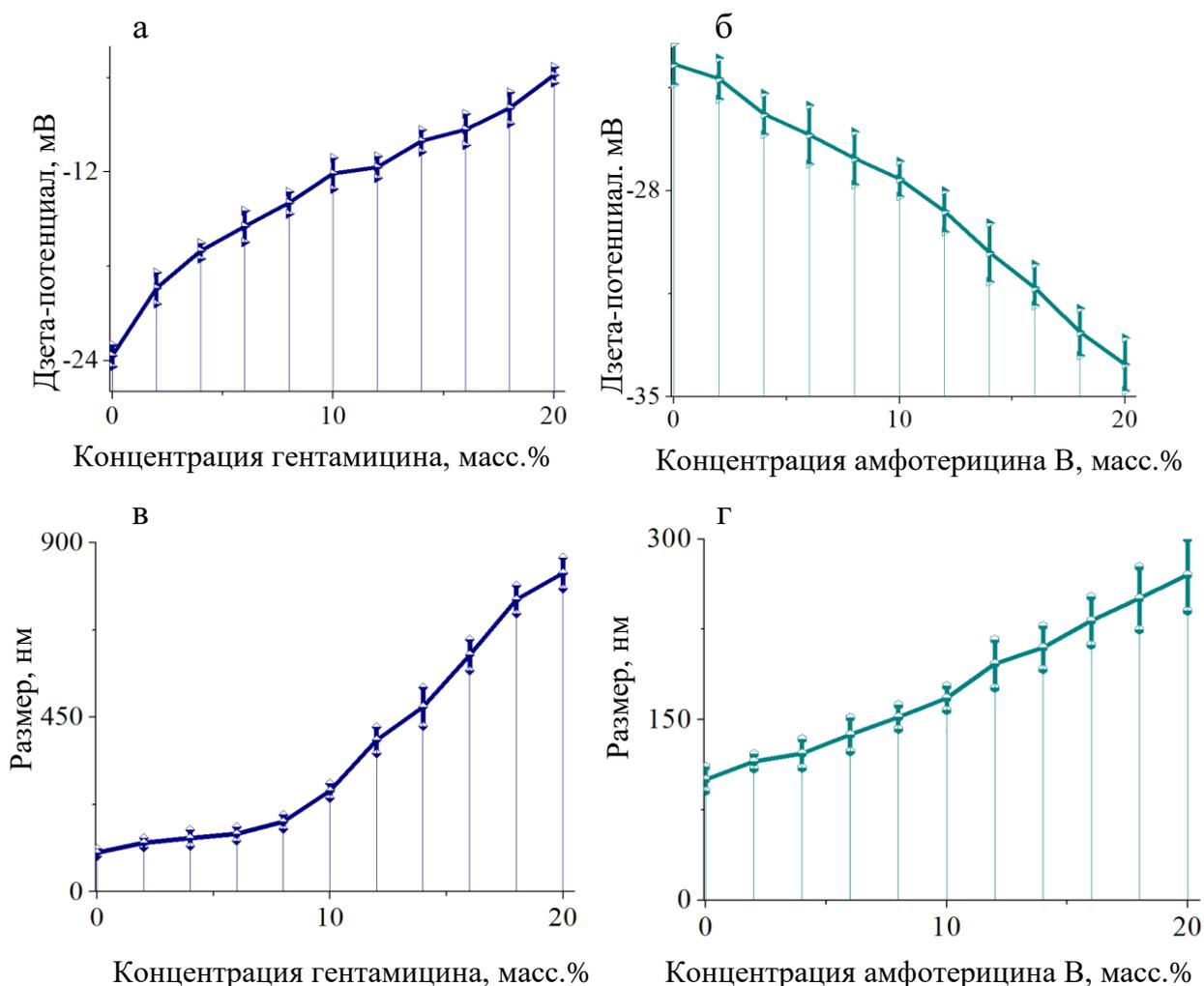


Рисунок 30 – Дзета-потенциал (а) и размер (б) НЧ VN/Ag, нагруженных гентамицином (а, в) и амфотерицином В (б, г), в зависимости от концентрации антибиотика

#### 4.4.2 Исследование наногридов методами РФЭС, ИК-Фурье спектроскопии

НЧ VN/Ag нагруженные гентамицином (4%) и амфотерицином В (1%) были проанализированы с использованием РФЭС и ИК-спектроскопии. На рисунке 31 приведены результаты исследования образцов методом ИК-спектроскопии. Результаты исследований согласуются с спектрами НЧ VN, так ИК-спектр образца VN/Ag-G4 содержит пики связей, относящихся к гентамицину (C – H при  $920\text{ см}^{-1}$ , C – O – C при  $1030\text{ см}^{-1}$  и N – H при  $3200\text{ см}^{-1}$ ). ИК-спектр образца VN/Ag-A1 содержит пики соответствующие молекуле амфотерицина В, о чем свидетельствует наличие валентных колебаний C – O, деформационных колебаний C = O и валентных колебаний C – H при  $1020\text{ см}^{-1}$ ,  $1700\text{ см}^{-1}$  и  $2900\text{ см}^{-1}$  соответственно.

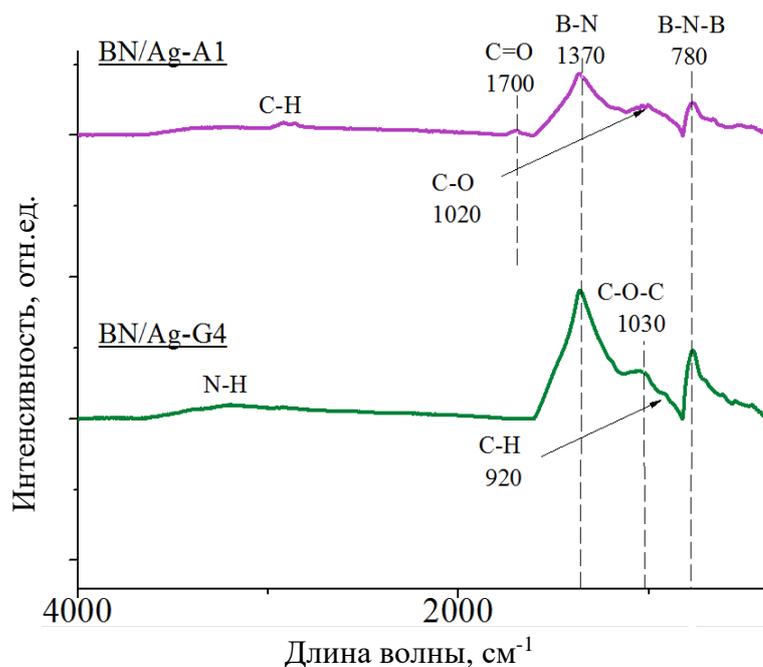


Рисунок 31 – ИК-спектры НЧ BN/Ag с антибиотиками

Результаты исследования химических связей и элементного состава нагруженных антибиотиками и частицами серебра НЧ BN с помощью РФЭС-анализа представлены на рисунке 32 и в таблицах 10 и 11. Помимо основного пика при 190,85 эВ, принадлежащего фазе BN, РФЭС спектры B1s показывают компоненту B–O при 192,2 эВ. Отношения пиков B–O/BN в образцах BN/Ag-G4 и BN/Ag-A1 ниже по сравнению с их аналогами, без Ag, что указывает на то, что образцы, не содержащие Ag, более окислены. Спектр РФЭС C1s образца BN/Ag-G4 аналогичен спектру BN-G4, однако стоит заметить, что площадь пика C–O/C–N образца BN/Ag-G4 больше по сравнению с образцом без Ag (таблица 9), что указывает на более высокую нагрузочную дозу антибиотика. Спектр РФЭС N1s подтверждает наличие BN и амидной группы C–N (пики при 398,3 и 399,37 эВ соответственно). Площадь пика C–N также больше по сравнению с образцом BN-G4. РФЭС-спектр C1s образца BN/Ag-A1 имеет три характерных пика, принадлежащих компонентам амфотерицина: амидам N–C=O (BE = 288,74 эВ), C–O/ C–N (BE = 286,61 эВ) и алкильным группам C–H (BE = 285,0 эВ). Спектр РФЭС N1s образца BN/Ag-A1 разделен на два компонента при 398,3 эВ (BN) и 399,37 эВ (CN). О серебре в образцах BN/Ag-G4 и BN/Ag-A1 свидетельствует наличие двух характерных пиков Ag3d 5/2 (368,74 эВ) и Ag3d 3/2 (374,77 эВ). Таким образом, успешная загрузка гентамицина и амфотерицина В в НЧ BN/Ag была подтверждена анализом РФЭС и ИК-спектроскопией.

Таблица 10 – Атомный состав НЧ, полученный по данным РФЭС

образец	концентрация, ат. %				
	[B]	[C]	[N]	[O]	[Ag]
BN/Ag-G4	38.4	9.8	33.4	17.9	0.5
BN/Ag -A1	37.8	10.4	28.4	22.9	0.5

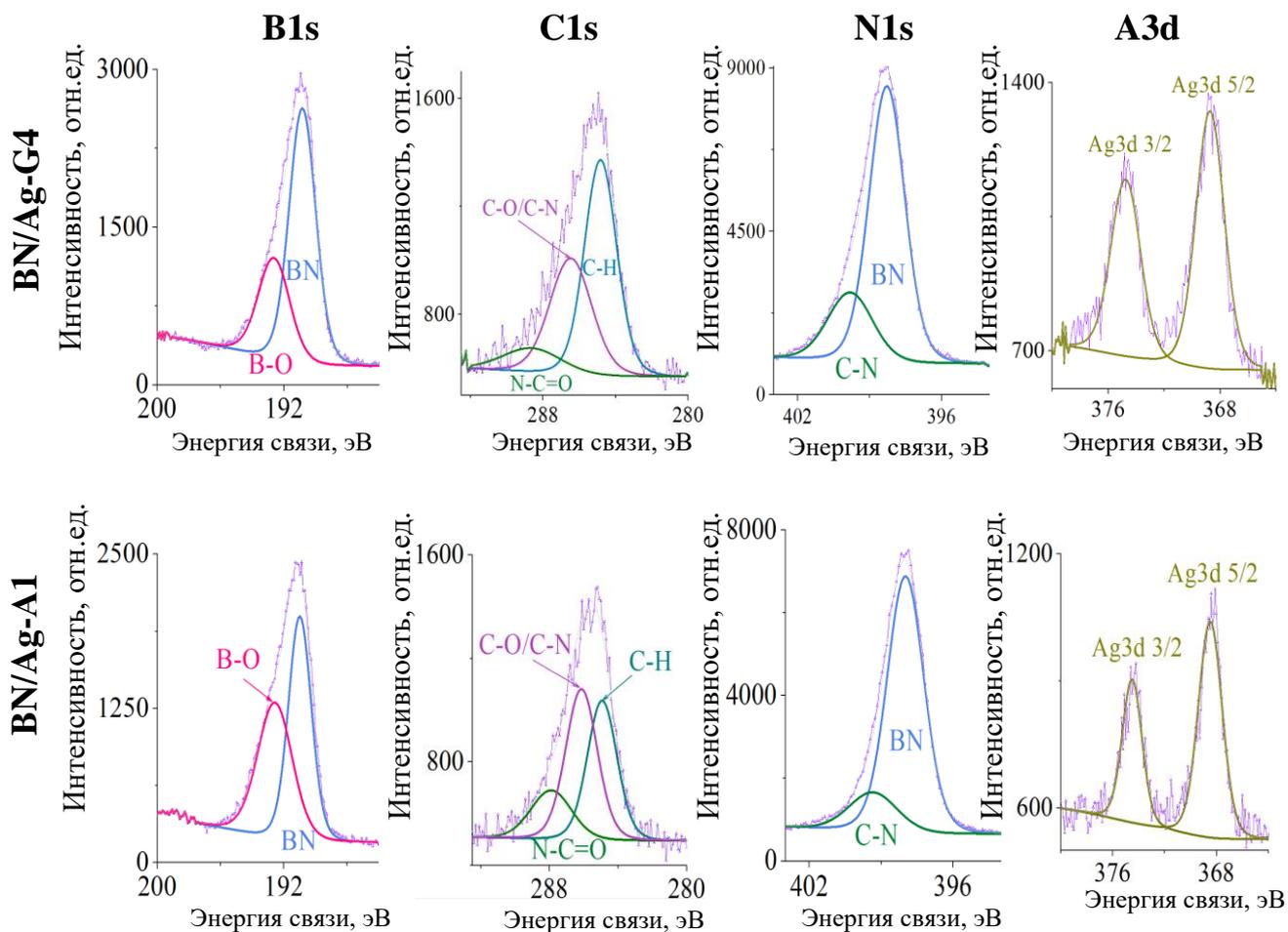


Рисунок 32 – РФЭС спектры НЧ BN/Ag с антибиотиками

Таблица 11 – Доли различных сред, оцененные с помощью подбора кривой РФЭС

образец	энергия связи, эВ						
	190.85	192.62	285.0	286.61	288.74	398.39	399.37
	концентрация, %						
	B1s		C1s			N1s	
	BN	B-O	C-H	C-O/C-N	N-C=O	BN	C-N
BN/Ag -G4	68.01	31.99	52.46	36.89	10.65	76.13	23.87
BN/Ag -A1	52.29	47.71	37.98	43.71	18.31	73.24	26.76

#### 4.4.3 Изучение стабильности и выхода бактерицидных ионов

На рисунке 33 показано количество ионов Ag, вымываемых с поверхности образцов в зависимости от времени. Покрытие поверхности НЧ слоем антибиотика, препятствует высвобождению ионов, из-за чего наблюдается снижение скорости выщелачивания ионов Ag<sup>+</sup>, по сравнению с их аналогами без антибиотиков. Образцы BN/Ag, нагруженные гентамицином и амфотерицином В, демонстрируют схожую кинетику высвобождения ионов Ag<sup>+</sup>. Через 1 и 7 дней концентрация ионов Ag в растворе составляет 220-240 и 375 мкг соответственно. Стоит отметить, что при испытании этих образцов содержание Ag в растворе не достигло насыщения даже через 7 дней выдержки.

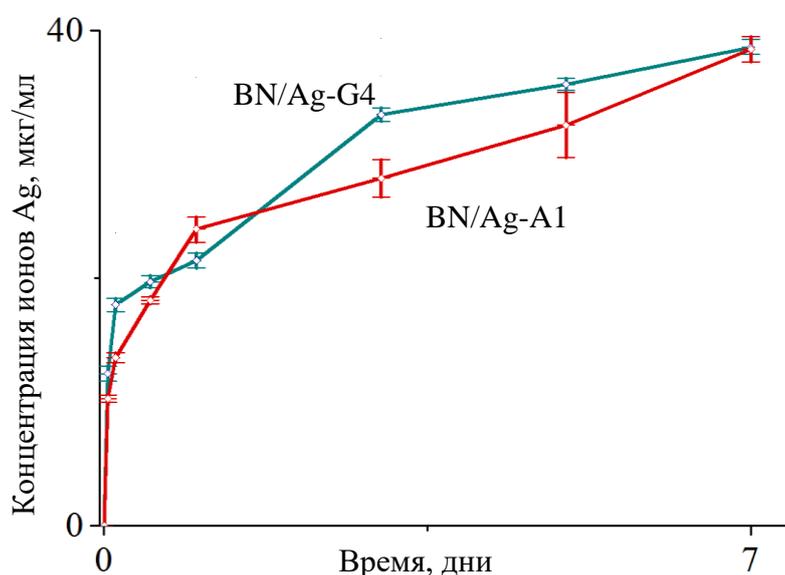


Рисунок 33 – Выход ионов Ag с поверхности НЧ

Результаты исследования стабильности суспензий НЧ BN/Ag с антибиотиками в воде представлены на рисунке 34. Полученные результаты можно сопоставить с данными НЧ BN с антибиотиками. В случае образца BN/Ag-G4 потеря стабильности также наблюдается после 24 ч выдержки, однако благодаря начальному более отрицательному значению дзета-потенциала наночастицы BN/Ag-G4 показывают лучший результат чем BN-G4. Аналогичная ситуация в случае образца BN/Ag-A1, стоит отметить, что поскольку амфотерицин В имеет отрицательный потенциал, суспензии стабильнее чем их аналоги с положительно заряженным гентамицином.

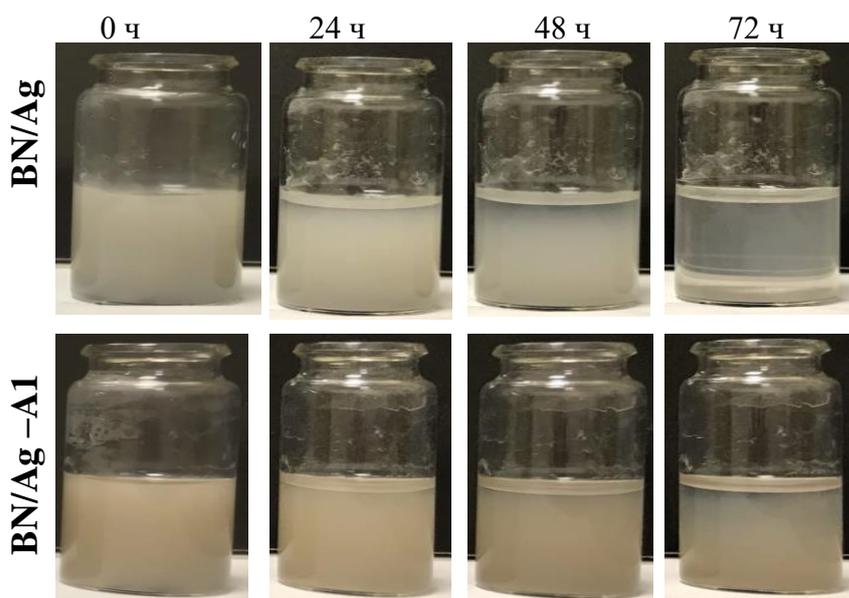


Рисунок 34 – Стабильность НЧ BN/Ag с антибиотиками

#### 4.4.4 Изучение выхода антибиотиков

На рисунке 35 представлены результаты исследования высвобождения антибиотиков в фосфатно-солевой буферный раствор с течением времени. Характер высвобождения антибиотиков сравним с результатами для наночастиц без серебра, поскольку взаимодействие молекул с НЧ носит чисто физический характер. Однако стоит отметить, что в интервале времени от 1 до 7 дней кумулятивное количество гентамицина для образцов BN-G4 и BN/Ag-G4 различно. Это можно объяснить либо повышенной удельной поверхностью наногбрида BN/Ag, либо эффектом интеркаляции Ag. Максимальное количество гентамицина достигается через 9 дней 500-520 мкг/мл и 95-100 мкг/мл для амфотерицина В.

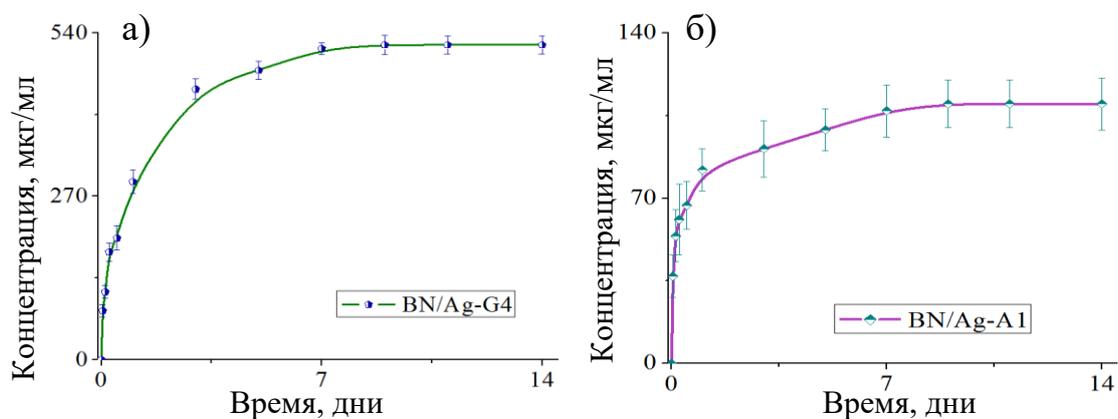


Рисунок 35 – Суммарное количество гентамицина (а) и амфотерицина В (б), выделившихся из НЧBN/Ag при их погружении в фосфатно-солевой буферный раствор (рН 7,4) в течение 14 дней

## **ГЛАВА 5. Биологические испытания**

### **5.1 Исследование бактерицидных свойств покрытий**

#### **5.1.1 Методика оценки бактерицидной активности путем подсчета количества КОЕ**

Бактерицидную активность чистых и нагруженных бактерицидными компонентами (антибиотики, *Me*) покрытий *h*-BN оценивали по отношению к устойчивому к антибиотикам бактериальному штамму *E. coli* K-261 (минимальная ингибирующая концентрация гентамицина MIC<sub>Gen</sub> = 128 мг/л), штамм *Bacillus* F, выделенный из вечной мерзлоты [226], *E. coli* U20, *S.aureus* MW2, *S.aureus* 839 и *Candida parapsilosis* ATCC90018. Все образцы помещали в отдельные лунки 24-луночного планшета, а затем добавляли 0,5 мл физиологического раствора. В качестве контроля использовали лунки без образцов с 0,5 мл физиологического раствора. Затем в каждую лунку вносили по 0,03 мл бактериальной культуры на физиологической основе. Тестировали различные концентрации клеток ( $10^4$ - $10^8$  клеток/мл). После инкубации в термостате при 37 °С в течение 3, 8 и 24 ч из каждой лунки отбирали аликвоты по 0,04 мл, раскладывали на чашки Петри, содержащие агар Мюллера-Хинтона (HiMedia, Индия), и инкубировали при 37 °С в течение 24 ч. для определения концентрации колониеобразующих единиц (КОЕ). Эксперименты проводились в трех экземплярах, а статистические расчеты выполнялись с использованием программы анализа данных Excell 2010 (Microsoft Corporation).

#### **5.1.2 Методика оценки бактерицидной активности с помощью диффузионных тестов в агаре**

Бактериальные клетки выращивали на плотной питательной среде Mueller Hinton Agar (HiMedia, Индия). Культуры грибов выращивали на плотной питательной среде (4 мл препарата Фогель, 2 г сахарозы и 2 г агара на 100 мл дистиллированной воды) в автоклавировании при 121°С в течение 15 мин. Бактерицидную активность определяли точечным (диффузионным) методом. Ночную культуральную суспензию каждого тест-штамма готовили в физиологическом растворе (9 г/л NaCl) с концентрацией клеток  $10^9$  КОЕ/мл по стандарту мутности, затем разбавляли в 1000 раз и наносили 100 мкл на твердую питательную среду. Для культуры грибов использовали споровую суспензию с концентрацией 30 мг/мл, из которой 0,2 мл наносили на чашку Петри. Затем тестируемые

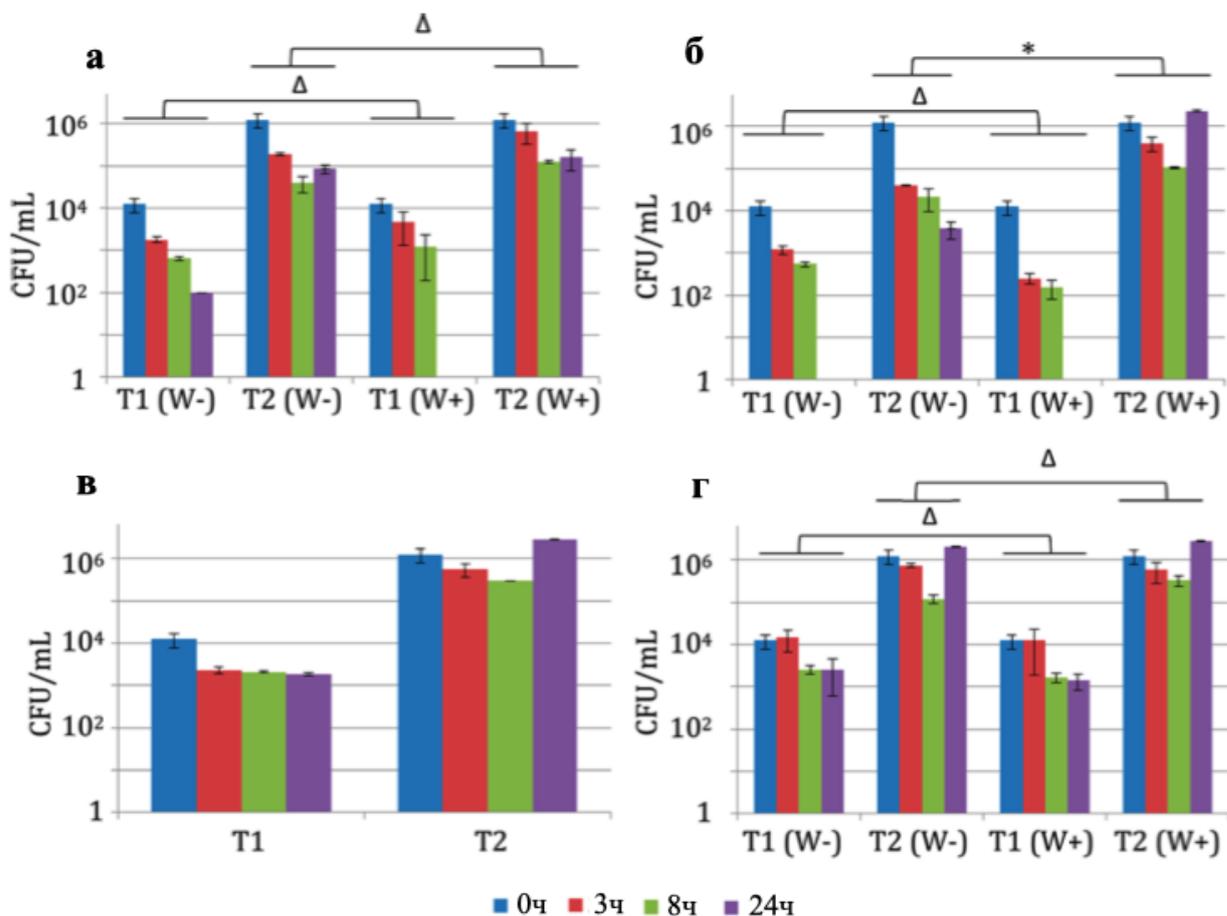
образцы помещали в чашки Петри и споры культивировали при 37°C в течение 24 ч. О бактерицидной и фунгицидной активности судили по наличию и ширине зоны ингибирования штамма вокруг образцов.

### 5.1.3 Бактерицидные свойства покрытий *h*-VN и *h*-VN/антибиотики

Бактерицидную активность покрытий *h*-VN без антибиотиков и с гентамицином (150 мкг/см<sup>2</sup>) в отношении штамма *E. coli* К-261 оценивали методом подсчета КОЕ. Бумажные фильтры с антибиотиками (F) и кремниевые пластины использовались в качестве эталонных материалов. Для изучения продолжительности антибактериального эффекта образцы были разделены на две группы. Каждый образец первой группы выдерживали в 0,5 мл физиологического раствора (0,9% NaCl) при 37 °C в течение 48 ч (далее W+). Образцы из второй группы без предварительной обработки в физиологическом растворе были обозначены как (W-). Было проведено два эксперимента с различными начальными концентрациями клеток (10<sup>4</sup> и 10<sup>6</sup>). Результаты представлены на рисунке 36. Контрольные образцы (лунка без образца и лунка с кремниевой пластиной) не были токсичными для клеток. Чистое покрытие VN продемонстрировало значительную антибактериальную активность. Количество выживших КОЕ постепенно уменьшалось в течение времени инкубации. В случае 10<sup>4</sup> клеток/мл значение КОЕ/мл снижалось на один (8 ч) и два порядка (24 ч). Предварительная экспозиция образца в физиологическом растворе не оказала существенного влияния на бактерицидную эффективность. Через 24 часа все бактериальные клетки были полностью инактивированы (рисунок 36а). Известно, что бактерии предпочитают колонизировать твердый субстрат, а не обитать в планктонном состоянии. Таким образом, разумно предположить, что бактерии погибали в результате физического разрушения при их контакте с острыми краями наноструктур VN. При более высокой исходной концентрации бактерий (10<sup>6</sup> клеток/мл) бактерицидный эффект был менее выражен, но через 24 ч составлял ~90 %.

Далее интересно сравнить бактерицидную активность образцов VN без гентамицина и с гентамицином. Образец G<sub>150</sub>/VN инактивировал примерно 90% клеток *E. coli* уже через 3 ч (рисунок 36б). Через 24 ч инкубации бактерицидный эффект составил 100 % (10<sup>4</sup> клеток/мл) и 99,5 % (10<sup>6</sup> клеток/мл). Как было описано выше, гентамицин интенсивно высвобождался из образца G<sub>150</sub>/VN в физиологический раствор. Таким образом, через 48 часов нагрузочная доза гентамицина в VN значительно уменьшилась. Тем не менее, в случае низкой концентрации клеток образец G<sub>150</sub>/VN сохранял высокую антибактериальную активность со снижением почти на 97 % КОЕ. Таким образом,

результаты показали, что антибактериальная эффективность образцов BN и G<sub>150</sub>/BN примерно одинакова.

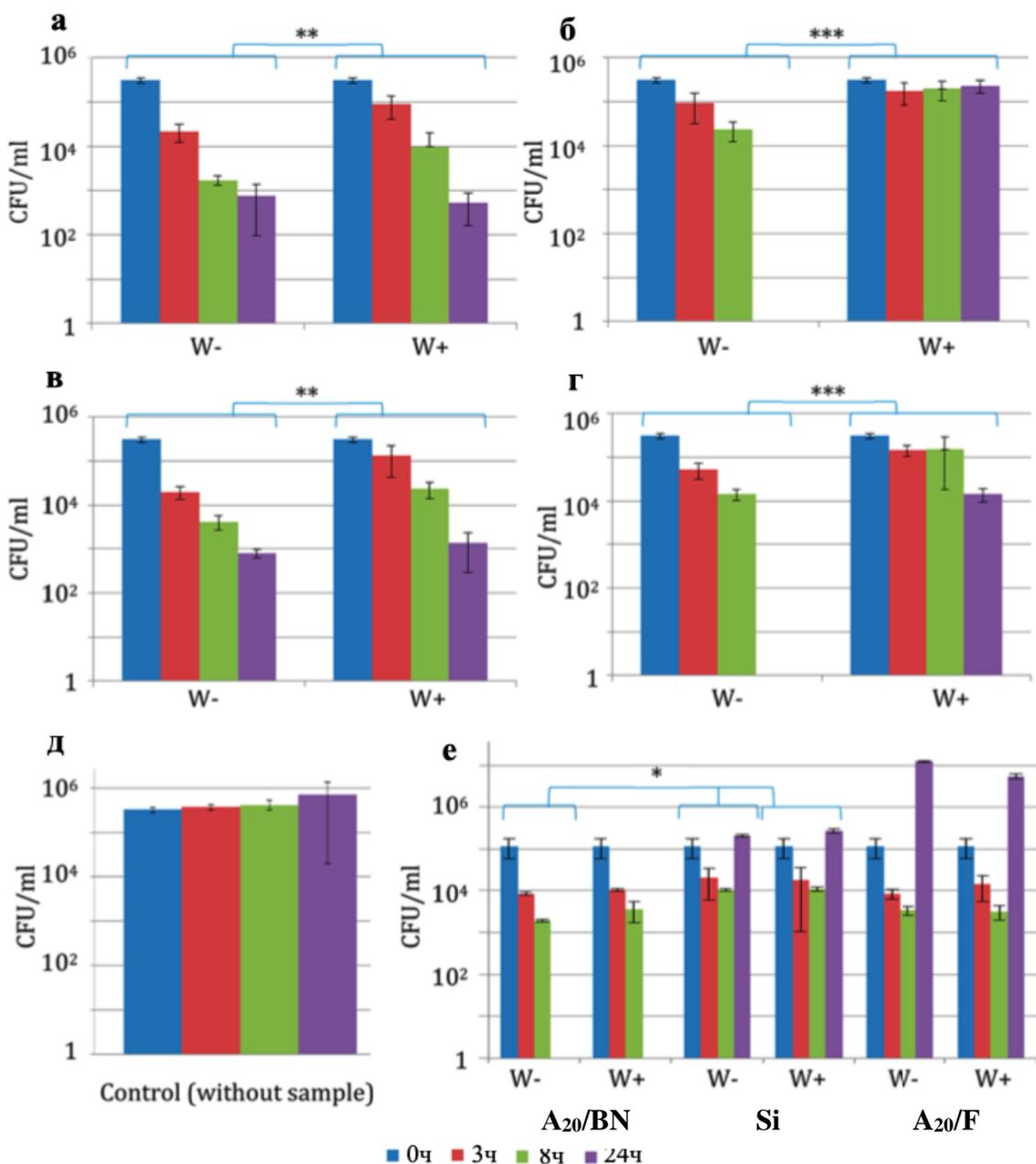


W– и W+ – образцы без предварительной обработки и после выдержки в физиологическом растворе в течение 48 ч соответственно. Каждый результат представляет собой среднее значение не менее чем трех параллельных экспериментов. Все данные представлены как среднее ± стандартное отклонение.  
\*  $p < 0,05$ ; Δ, статистически значимых различий нет

Рисунок 36 – Бактерицидная активность образцов в отношении штамма *E. coli* K-261. (а) BN, (б) G<sub>150</sub>/BN, (в) контроль (лунка без пробы) и (г) контроль (Si). T1 (10<sup>4</sup> клеток/мл) и T2 (10<sup>6</sup> клеток/мл): разные исходные концентрации *E. coli*.

Для более широкой защиты от бактерицидной и фунгицидной инфекции требуется комбинация нескольких антибиотиков. На рисунке 37 показана бактерицидная активность покрытий BN с гентамицином (150 и 300 мкг/см<sup>2</sup>) и амфотерицином В (100 мкг/см<sup>2</sup>) в отношении бактерий *E. coli*. Образцы G<sub>150</sub>-A<sub>100</sub>/BN и G<sub>300</sub>-A<sub>100</sub>/BN продемонстрировали высокую бактерицидную эффективность как до, так и после выдержки в физиологическом растворе (рисунок 37а, в). Образцы W- показали снижение КОЕ на 93% (3 часа) и 99,8% (24 часа). После погружения в физиологический раствор на 48 ч (образцы W+) бактерицидный эффект был менее выражен через 3 и 8 ч, но количество КОЕ уменьшилось более чем на два порядка через 24 ч. По сравнению с контрольными

образцами (бумажные фильтры с антибиотиками), в которых бактерицидный эффект значительно снижался после воздействия физиологического раствора в течение 48 ч за счет высвобождения гентамицина (рисунок 37б, г), покрытия VN демонстрируют выраженный и пролонгированный бактерицидный эффект. Также стоит отметить, что присутствие амфотерицина В не снижало бактерицидную активность образца.



W– и W+ – образцы без предварительной обработки и после выдержки в физиологическом растворе в течение 48 ч соответственно. F означает бумажный фильтр. Все данные представлены как среднее ± стандартное отклонение (SD). Каждый результат представляет собой среднее значение не менее чем трех параллельных экспериментов. \*\*\*p < 0,0001; \*\*p < 0,001; \*p < 0,05

Рисунок 37 – Бактерицидная активность образцов в отношении штамма *E. coli* K-261. (а) G<sub>150</sub>-A<sub>100</sub>/BN, (б) G<sub>150</sub>-A<sub>100</sub>/F, (в) G<sub>300</sub>-A<sub>100</sub>/BN, (г) G<sub>300</sub>-A<sub>100</sub>/F, (д) контроль (без образца), (е) A<sub>20</sub>/BN, A<sub>20</sub>/F и Si.

#### 5.1.4 Изучение контактного-взаимодействия материалов с бактериями

Для выяснения механизма взаимодействия клеток и покрытия VN был проведен подробный ПЭМ-анализ поверхности раздела клеток/покрытие. На рисунке 38а показан фрагмент покрытия VN. Клетки *E. coli* в контрольном образце (без покрытия VN), осажденные на углеродной сетке (рисунок 38б), имеют темный однородный внутренний контраст и четко выраженную прозрачную клеточную мембрану. Несколько микрофотографий ПЭМ демонстрируют клетки *E. coli*, которые находятся в непосредственном контакте с фрагментами покрытия. Видно, что острые наноструктуры поверхности VN каким-то образом повреждают клеточную мембрану и проникают внутрь клеток (рисунок 38в, г, д). Поврежденные участки клеток имеют характерный яркий контраст на темном фоне (рисунок 38в). Таким образом, можно предположить, что при контакте бактерий с поверхностью покрытия VN их мембраны могут быть повреждены. Это приводит к потере целостности клеток и изменению контраста изображения. Мертвая клетка имеет яркий контраст (рисунок 38е). Недавно было высказано предположение, что гибель клеток может происходить из-за способности вертикально ориентированных углеродных нанотрубок накапливать и выделять упругую энергию при деформации, когда они контактируют с прикрепляющимися клетками [209]. Выступающие из покрытия наноструктуры VN соприкасаются с поверхностью клетки под разными углами и могут дополнительно отклоняться при прикреплении бактерий. Результаты анализа ПЭМ-изображений свидетельствуют о том, что мембраны клеток *E. coli* повреждаются наноструктурированной поверхностью VN, что приводит к гибели клеток. Скорость инактивации бактерий поверхностными наноэлементами VN сравнима с терапевтическим эффектом гентамицина при его МИК.

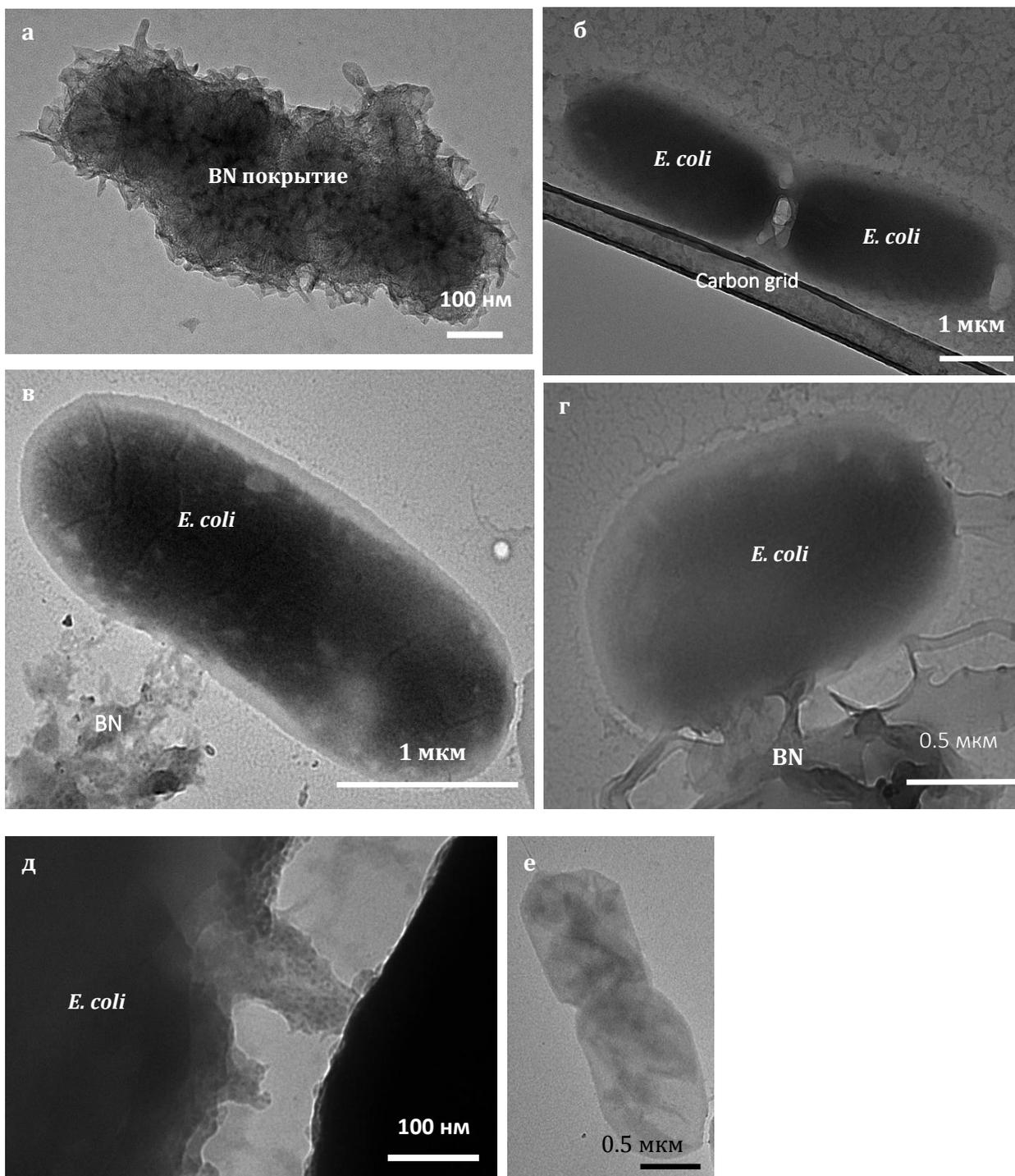


Рисунок 38 – ПЭМ-изображения фрагмента покрытия BN (а), контрольных клеток *E. coli* (б) и клеток *E. coli* после их контакта с покрытием BN (в-е). Момент взаимодействия и механического повреждения клеток (в-д). Погибшая клетка (е)

### 5.1.5 Исследование генерации АФК

Известно, что активные формы кислорода вызывают у бактерий окислительный стресс, способствуя тем самым общему бактерицидному эффекту. Была исследована способность покрытий BN генерировать АФК как до, так и после УФ-облучения в течение 60 мин (для имитации условий стерилизации образцов). Результаты указывают на

отсутствие влияния УФ-облучения на концентрацию флуоресцеина (рисунок 39). В течение первых 3 ч в обоих образцах не наблюдалось образования АФК, но затем концентрация АФК начала увеличиваться, достигая 96–130 и 540–570 нмоль/см<sup>2</sup> через 8 и 24 ч соответственно. Принимая во внимание, что наибольший бактерицидный эффект в отношении штамма *E. coli* K-261 наблюдался через 24 ч, можно предположить, что в случае чистого образца BN имеет место синергический бактерицидный эффект от механического воздействия и окислительный стресс АФК. Целостность бактериальной цитоплазматической мембраны (липидный бислой) важна для восстановления поврежденных бактериальных клеток в процессе их репарации [227].

АФК чрезвычайно реактивны и могут разрушать бактериальные мембраны. АФК, образующиеся из наночастиц *h*-BN, могут окислять липидные компоненты мембраны в месте физического повреждения клетки из-за особенностей поверхности наноструктурированной пленки, что приводит к перекисному окислению липидов и гибели клеток [228]. Поскольку многочисленные нанопластинки и наноиголки торчат из наночастиц BN, возможное присутствие ненасыщенных атомов В (радикалов В) на их краях может привести к образованию АФК, что приведет к гибели клеток [229]. Наконец, обратите внимание, что, хотя *h*-BN известен как гидрофобный материал, он может подвергаться гидролизу. Связи В–N вблизи дефектных участков могут быть разорваны в результате взаимодействия с атомом кислорода молекулы воды. Сообщалось, что деградация *h*-BN сопровождается образованием группы В–О борной кислоты и гидроксильных (-ОН) групп [230, 231].

Также важно отметить, что уровень АФК в разных условиях может различаться. Существует несколько факторов, которые могут усиливать или ослаблять эффект АФК, например, состав раствора *in vitro*, используемый для изучения образования АФК, и антиоксидантный эффект *in vivo* [232, 233].

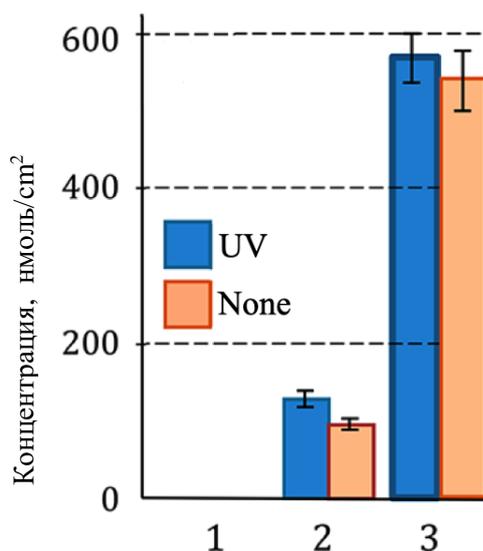


Рисунок 39– Концентрация флуоресцеина, образующегося в физиологический раствор после УФ-облучения в течение 1 ч. 1–3 ч, 2–8 ч и 3–24 ч

### 5.1.6 Покрытия *h*-BN/Me

#### 5.1.6.1 Оценка бактерицидной активности путем подсчета количества КОЕ

Бактерицидную активность оценивали в отношении четырех типов штаммов: *E. coli* K-261 (ампициллин-, амоксициллин-, цефотаксим-, цiproфлоксацин- и гентамицин-резистентный), *E. coli* U20 (ампициллин-, амоксициллин-резистентный), *S. aureus* MW2 и штаммы *S. aureus* 839. Для каждого испытанного образца количество КОЕ через 0, 3, 8 и 24 ч показано на рисунке 40. В образцах, легированных Fe, наблюдается четкая зависимость: чем выше содержание Fe, тем сильнее бактерицидный эффект. Образцы BN/Fe700, BN/Fe500, BN/Fe300 и BN/Fe150 показали выраженный бактерицидный эффект в отношении штамма *E. coli* K-261 с примерно 1-логарифмическим снижением числа КОЕ уже через 8 часов. Через 24 часа все бактериальные клетки были подавлены (рисунок 40а). Кроме того, Fe-содержащие образцы показали высокую бактерицидную активность в отношении штамма *E. coli* U20 (рисунок 40в); все клетки были инактивированы через 3 ч (BN/Fe700), 8 ч (BN/Fe500) и 24 ч (BN/Fe300, BN/Fe150, BN/Fe50 и BN/Fe30). Покрытия с Fe также были эффективны против штаммов *S. aureus* MW2 и 839 (рисунок 40б, г). Образцы BN/Fe700 и BN/Fe150 показали 99,99% снижение КОЕ *S. aureus* MW2 и 839 КОЕ соответственно уже через 8 часов. Все другие образцы, включая исходное покрытие *h*-BN, убивали все клетки *S. aureus* через 24 часа. Для определения МИК исходные концентрации FeCl<sub>3</sub> 30, 50, 150, 300, 500 и 700 мкг/см<sup>2</sup> были переведены в Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: 15, 25, 74, 148, 246 и 344 мкг/см<sup>2</sup> соответственно. Результаты показывают, что МИК оксида

железа составляет  $74 \text{ мкг/см}^2$  для эффективного подавления всех четырех типов штаммов при их исходной концентрации  $10^4 \text{ КОЕ/мл}$ .

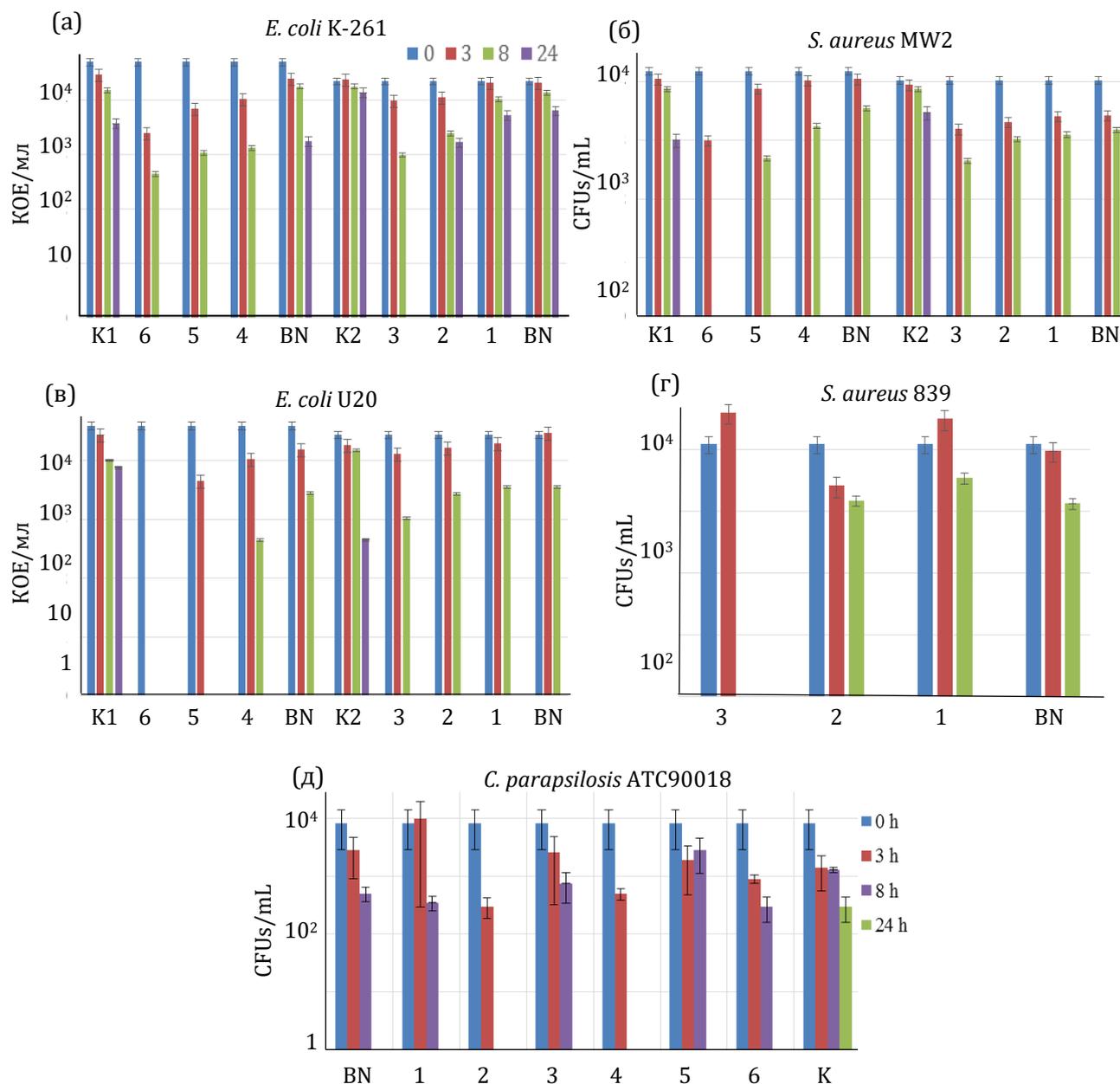


Рисунок 40 – Бактерицидная активность образцов против *E. coli* K-261(a), *S. aureus* MW2 (б), *E. coli* U20 (в), *S. aureus* 839 (г), и *C. parapsilosis* ATC900018 (д). K1 and K2 – controls, BN/Fe30 – 1, BN/Fe50 – 2, BN/Fe150 – 3, BN/Fe300 – 4, BN/Fe500 – 5, BN/Fe700 – 6

Покрyтия BN, легированные Fe, также были протестированы против грибка *C. parapsilosis* ATCC90018. Этот вид грибковой культуры особенно опасен для людей с ослабленным иммунитетом, а его присутствие может привести к серьезным инфекциям и сепсису. Все протестированные образцы показали 99,99% фунгицидный эффект через 8 часов (рисунок 40д). Две пробы (BN/Fe50 и BN/Fe300) привели к полной гибели культуры

гриба уже через 3 ч, однако по содержанию Fe закономерности не наблюдалось. Необходимы дополнительные тесты для более точного определения динамики процесса дезактивации *S. parapsilosis*.

По сравнению с Fe, НЧ Ag проявляют более сильный бактерицидный эффект при более низкой концентрации. Это может быть связано с одновременным действием ионов Ag и АФК. Образцы BN/Ag100, BN/Ag50 и BN/Ag25 убивали все клетки *E. coli* K-261, *E. coli* U20 и *S. aureus* MW2 уже через 3 ч (рисунок 41а-в). При меньшем содержании Ag бактерицидная эффективность Ag-содержащих образцов различна. Покрытия BN/Ag18, BN/Ag12 и BN/Ag6 эффективно ингибировали рост штаммов *E. coli* K-261 и U20 в течение 3–8 ч (рисунок 41а, в). Эти образцы показали снижение количества КОЕ *S. aureus* MW2 через 24 часа на 99,99%, но при более высокой исходной концентрации клеток  $10^8$  КОЕ/мл (рисунок 41б). Клетки *S. aureus* 839 полностью подавлялись через 8 ч (BN/Ag18) и 24 ч (BN/Ag12). Наконец, обратите внимание, что образец с самым низким содержанием Ag (BN/Ag6) показал почти 3-логарифмическое снижение КОЕ штамма *S. aureus* 839 через 24 часа (рисунок 41г). Так, при достижении 99,99% бактерицидного действия в отношении всех видов штаммов МИК Ag в покрытиях BN/Ag составляет  $12 \text{ мкг/см}^2$ , что на порядок ниже, чем для оксида железа.

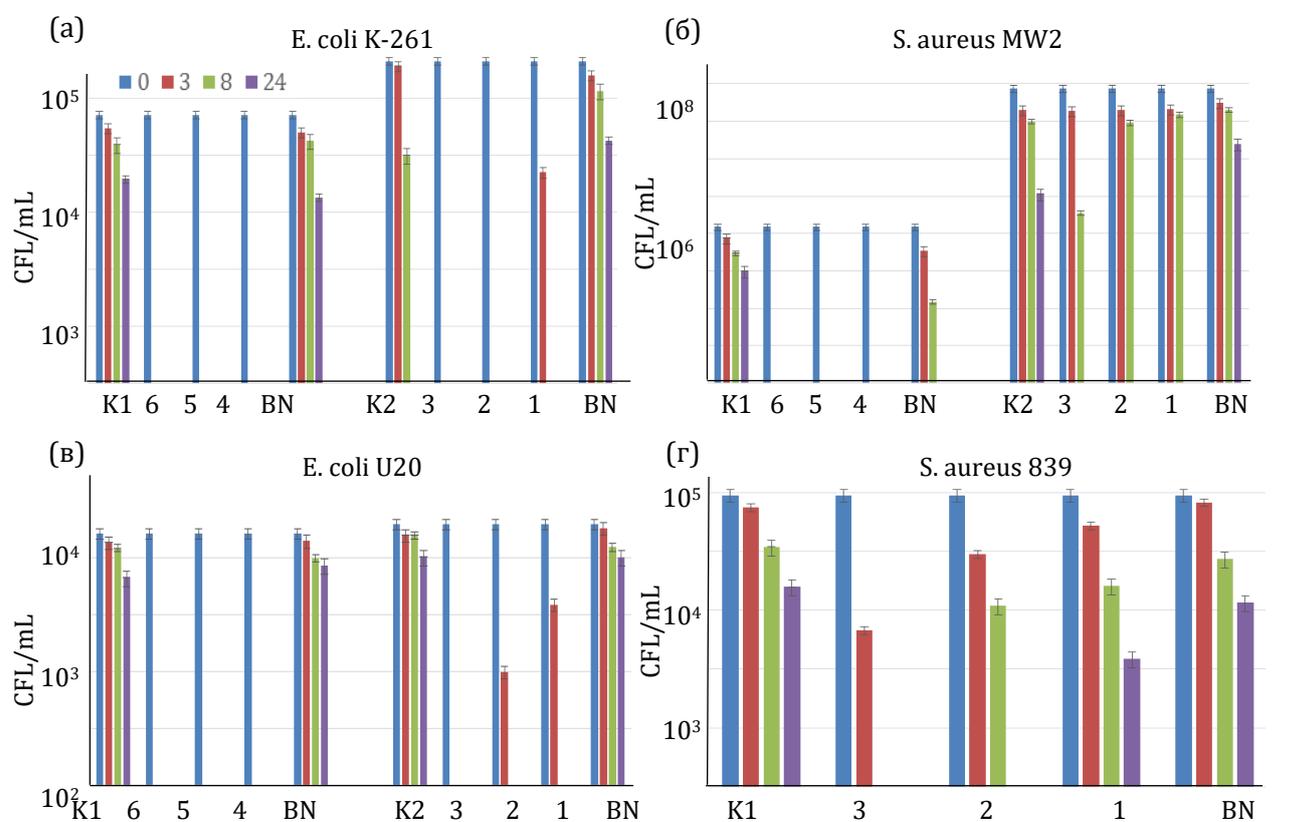


Рисунок 41 – Бактерицидная активность образцов K1 и K2 – контроли, BN/Ag100 – 1, BN/Ag50 – 2, BN/Ag25 – 3, BN/Ag18 – 4, BN/Ag12 – 5, BN/Ag6 – 6

### 5.1.6.2 Оценка бактерицидной активности с помощью тестов на диффузию в агар

Результаты диффузионных испытаний в агаре обобщены в таблице 12.

Таблица 12 – Зоны ингибирования образцов

Штамм	Диаметр зоны ингибирования, мм						
	BN	BN/Fe30	BN/Fe50	BN/Fe150	BN/Ag25	BN/Ag50	BN/Ag70
<i>Candida albicans</i> ATCC90028	0	0	0	0	0	0	0
<i>Candida albicans</i> ATCC24433	0	0	0	0	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i> MW2	0	0	0	1.0±0.5	1.5±0.5	1.5±0.5	1.5±0.5
<i>Escherichia coli</i> U20	0	0	0	0	2.0±0.5	2.0±0.5	2.0±0.5
<i>Escherichia coli</i> K261	0	0.5±0.5	0.5±0.5	0.5±0.5	2.0±0.5	2.0±0.5	2.0±0.5
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	0	0	0	0	3.0±0.5	3.0±0.5	3.0±0.5
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC90018	0	0	0	0	3.0±0.5	4.0±0.5	6.0±0.5
<i>Bacillus cereus</i> Arc30	0	0	0	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i> C600	0	0	0	0	1.0±0.5	3.0±0.5	3.0±0.5
<i>Candida auris</i> CBS10913	0	0	0	0	1.0±0.5	3.0±0.5	3.0±0.5
<i>Neurospora crassa</i> wt	0	0	0	0	+ <sup>*)</sup>	+	+
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC33400	0	2.0±0.5	2.0±0.5	3.0±0.5	5.0	0	0

+ обозначает частичное ингибирование клеток.

Образцы BN, BN/Fe30, BN/Fe50, BN/Fe150, BN/Ag25, BN/Ag50 и BN/Ag70 (вместо BN/Ag100, используемых в тесте для подсчета клеток) тестировали против двенадцати бактериальных и грибковых культур: *C. albicans* ATCC90028 и ATCC24433, *C. parapsilosis*

ATCC90018, *C. auris* CBS10913, *S. aureus* MW2 и ATCC25923, *E. coli* U20, K261 и C600, *B. cereus* Arc30, *S. pneumoniae* ATCC33400 и *N. crassa* wt. Материалы, содержащие Fe, проявляли бактерицидную активность только в отношении *E. coli* K261 и *S. pneumoniae* ATCC33400. Хотя образцы BN/Fe30, BN/Fe50 и BN/Fe150 уничтожали все клетки *S. aureus* MW2 и 839 через 24 часа в тестах подсчета клеток, в тестах на диффузию в агар начальная концентрация клеток была на четыре порядка выше, что может объяснить разницу между результатами.

Ag-содержащие покрытия BN показали бактерицидную активность в отношении штаммов *S. aureus* MW2 и ATCC25923, *E. coli* K261 и C600, *S. aureus* ATCC25923, *C. parapsilosis* ATCC90018 и *C. auris* CBS10913. В случае *N. crassa* wt наблюдалось частичное ингибирование. В образце BN/Ag25 обнаружена широкая зона ингибирования штамма *S. pneumoniae* ATCC33400. Удивительно, но покрытия с высоким содержанием Ag не проявляли бактерицидной активности в отношении *S. pneumoniae* ATCC33400, что требует дополнительной проверки. В целом, для трех типов бактериальных клеток, используемых для подсчета клеток и тестов на диффузию в агар (*S. aureus* MW2, *E. coli* K261 и U20), наблюдается хорошее совпадение результатов.

### 5.1.6.3 Исследование генерации АФК

Активные формы кислорода вызывают у бактерий окислительный стресс, приводящий к различным клеточным дисфункциям. В нашем исследовании в качестве флуоресцентного индикатора уровня АФК использовали DCFH-DA. На рисунке 42 представлена зависимость концентрации флуоресцеина от времени для образцов BN/Fe30, BN/Fe50, BN/Fe150, BN/Ag6, BN/Ag12 и BN/Ag18. Все материалы демонстрируют сходную кинетику генерации АФК. Через 3 ч концентрация флуоресцеина была ниже 50 нмоль/см<sup>2</sup>, но затем повышается до 120-200 (8 ч) и 400-650 (24 ч) нмоль/см<sup>2</sup>. Мы не наблюдали статистически значимой разницы в концентрации флуоресцеина между тестируемыми образцами. Кроме того, концентрация АФК, генерируемых Fe- и Ag содержащими образцами BN через 24 ч, не отличалась от таковой для исходного покрытия BN [235].

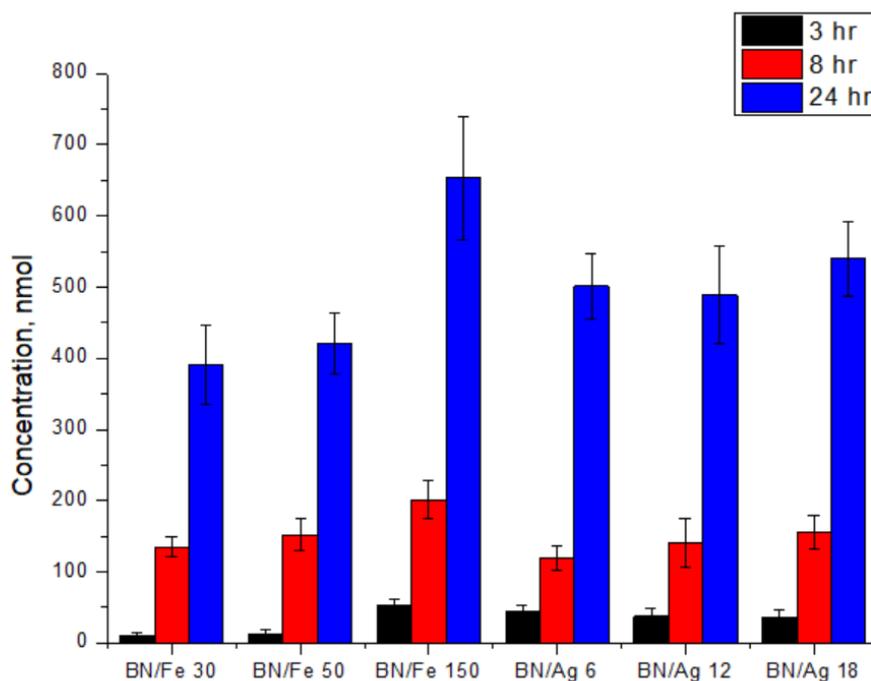


Рисунок 42 – Концентрация флуоресцеина, образующегося в физиологический раствор после УФ-облучения в течение 1 ч

#### 5.1.6.4 Сравнение результатов бактерицидного действия Ag и Fe

При разработке бактерицидных и фунгицидных поверхностей НЧ/пленки металлов и их оксиды являются хорошей альтернативой поверхностно-связанным антибиотикам. В данной работе изучено влияние НЧ металлического Ag и НЧ/пленки оксида железа, расположенных на поверхности наноструктурированных пленок *h*-BN, на рост грамотрицательных (полирезистентных *E. coli*) и грамположительных (*S. aureus*, *B. cereus*, *S. pneumoniae*) бактериальные штаммы и культуры грибов (*C. auris/parapsilosis/albicans* и *N. crassa*). Полученные результаты свидетельствуют о значительном снижении удельной скорости роста возбудителей. Ингибирующее действие добавок зависит от концентрации и специфично для каждого вида бактерий и грибов. Следует отметить, что сравнение бактерицидного и фунгицидного действия материалов *h*-BN/Ag и *h*-BN/Fe с литературными данными достаточно затруднительно, так как различаются не только частицы-носители по элементному и фазовому составу, но и а также нагрузочная доза бактерицидных компонентов, тип их агломерации, а также вид исследуемых бактериальных и грибных культур, их начальная концентрация и др. Полученные нами результаты показывают, что бактерицидная эффективность (время, необходимое для полной инактивации бактерий) зависит от тип штамма и концентрация бактерицидного компонента в образце.

Сравнивая НЧ металлического Ag и оксида железа, можно отметить, что каждый материал имеет определенные преимущества. Антибактериальный эффект НЧ Ag более выражен при низких концентрациях и имеет более широкий спектр действия [237]. Он достигается за счет образования АФК и высвобождения ионов Ag<sup>+</sup>, но Ag может быть токсичен даже при низкой концентрации. Напротив, НЧ оксида железа, хотя и проявляют меньшую токсичность при той же концентрации, более безопасны и обладают лучшей биосовместимостью *in vitro* и *in vivo* [238].

Если взять для сравнения точку отсчета 24 ч, то Ag-содержащие покрытия *h*-BN проявляют 99,99% бактерицидный эффект при концентрации Ag 12 мкг/см<sup>2</sup>. Бактерицидный эффект покрытий Ag/*h*-BN был выше при несколько меньшей концентрации, чем у нанопокровов Ag, нанесенных на кожаные материалы (75% (10 мкг/см<sup>2</sup>) и 99,25% (20 мкг/см<sup>2</sup>) против *E. coli* ATCC 12228 и 99,91 (10 мкг/см<sup>2</sup>) и 99,99 (20 мкг/см<sup>2</sup>) против *S. aureus* ANCC 6538-P) [239].

Штамм *S. pneumoniae* ATCC33400 оказался наиболее чувствительным к оксиду железа, так как зона ингибирования наблюдалась при самой низкой из изученных концентраций оксида железа 15 мкг/см<sup>2</sup> (образец BN/Fe30). В то же время образцы BN/Ag25, BN/Ag50 и BN/Ag70 не ингибировали рост штаммов *C. albicans* и *B. cereus* Arc30. Устойчивость *C. albicans* к действию Ag/BN материала может быть связана с наличием мутации в гене ERG11, приводящей к снижению фунгицидной активности [240]. Было показано, что *B. cereus* Arc30 устойчив к экстремальным напряжениям, так как он был изолирован от вечной мерзлоты [241].

Все образцы, легированные Fe, с концентрацией оксида железа 74 мкг/см<sup>2</sup> показали эффективность 99,99% в отношении штаммов *E. coli* K-261, *E. coli* U20, *S. aureus* MW2, *S. aureus* 839 и *C. parapsilosis* ATCC90018 при исходной концентрации клеток 10<sup>4</sup> КОЕ/мл. Это можно объяснить достижением критической концентрации ионов Fe в исследуемом растворе. Действительно, через 24 ч она возрастает от 20 мкг/см<sup>2</sup> (BN/Fe30) до 30 мкг/см<sup>2</sup> (BN/Fe50) и далее до 57 мкг/см<sup>2</sup> (BN/Fe150). Высвобожденные ионы Fe могут реагировать с тиоловыми группами белков на поверхности бактериальной клетки, что приводит к лизису клеток [242]. Обратите внимание, что для сравнения покрытия Fe/BN обеспечивают более широкую и эффективную защиту по сравнению с TiO<sub>2</sub>, легированным Fe (3-6% Fe) [243] и ZnO (2-8% Fe) [244]. Для чистых НЧ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> значения МИК составили 250 мкг/мл (*S. aureus* и *Pseudomonas aeruginosa*) и 500 мкг/мл (*Corynebacterium* и *Klebsiella pneumoniae*) [245]. НЧ гематита -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> вызывали полное ингибирование *E. coli*. MG 1655 при 100 мкг/мл, но не влиял на *S. aureus* ATCC 6538 даже при 1000 мкг/мл [246]. Широко распространено мнение, что бактерицидная активность обусловлена присутствием АФК,

генерируемых различными оксидами переходных металлов. Пероксид водорода, продуцируемый оксидами металлов, разрушает бактериальную мембрану и приводит к ее гибели [247]. Кроме того, АФК вместе с супероксидными радикалами и синглетным кислородом, образуемым оксидом железа, могут быть причиной ингибирования бактерий. Fe в дозе индуцирует зависимым образом, все формы гибели клеток, включая апоптоз и некроз [248]. Ионы железа могут либо непосредственно повреждать клеточные компоненты, либо генерировать токсичные АФК посредством следующих реакций.



Положительный поверхностный заряд НЧ оксида железа также может вызывать гибель клеток, поскольку патогены с отрицательным зарядом электромагнитным образом притягиваются к поверхности НЧ, окисляются и мгновенно погибают [249]. Однако эффективность этого механизма ограничена количеством железа. оксидная фаза на поверхности *h*-BN. Кроме того, мертвые бактерии, если их не удалить с поверхности покрытия, могут экранировать НЧ. Поскольку покрытия *h*-BN имеют отрицательный поверхностный заряд, этот механизм не вносит большого вклада в общий антибактериальный эффект. Полученные результаты показывают, что НЧ оксида железа проявляют дифференцирующее действие на грамотрицательные и грамположительные бактерии, вероятно, за счет различий в строении клеточных стенок бактерий. Грамотрицательные бактерии имеют дополнительный барьер для проникновения внешних видов в виде тонкого слоя пептидогликана между цитоплазматической мембраной и наружной мембраной. НЧ оксида железа могут концентрироваться между внешней и внутренней мембранами клеточной стенки грамотрицательных бактерий и могут быть дезактивированы ассоциированным с мембраной комплексом формиат-гидролиазы во внутренней мембране *E. coli*. [250]. Таким образом, грамположительные бактерии более чувствительны к действию НЧ оксида железа [244, 251].

Еще одним важным фактором, определяющим их антибактериальные свойства, является степень окисления железа на поверхности НЧ. Например, было показано, что НЧ Fe в среде бульона Мюллера-Хинтона непрерывно окисляются до FeO (Fe(II)) и далее до Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (Fe(III)) [251]. НЧ с внешним слоем Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> эффективно ингибируют грамположительные *Bacillus subtilis* 3610 и *Bacillus thuringiensis* 407, но не влияют на рост грамотрицательных штаммов *E. coli* K12 и ATCC 11634. Более низкая степень окисления Fe обеспечивает более сильный антибактериальный эффект за счет образования свободных электронов в процессе окисления. НЧ Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> проявляют более выраженный

бактериостатический эффект по сравнению с НЧ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> [252]. Наноразмерные частицы оксида железа широко используются в биомедицине и биотехнологии. В дополнение к использованию в качестве бактерицидных агентов, суперпарамагнитные НЧ оксида железа находят применение для магнитно-индуцированного лечения опухолей с помощью гипертермии, [253] в качестве контрастных агентов для ядерной магнитно-резонансной томографии и магнитного разделения клеток [254].

Ранее был отмечен бактерицидный эффект исходного покрытия BN [235]. Было показано, что после УФ-облучения покрытие BN генерирует АФК, которые могут разрушать бактериальную мембрану. В нашем случае бесжелезистое покрытие BN было эффективным против штаммов *E. coli* U20, *S. aureus* MW2 и *S. aureus* 839, но не против *E. coli* K-261. Таким образом, разумно предположить наличие синергетического бактерицидного действия АФК окислительного стресса и фазы оксида железа.

## **5.2 Исследование бактерицидных свойств наночастиц**

### **5.2.1 Методика исследования бактерицидных свойств**

Бактерицидную активность чистых и нагруженных антибиотиками НЧ BN и BN/Ag оценивали в отношении госпитальных штаммов широкого спектра бактерий: грамположительных *Staphylococcus aureus* B8469 и MW2 и грамотрицательных *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853, B1307/17) и *Escherichia coli* (A19, A2498, A31, A917, ATCC25922, ATCC35218, C600, K261, K353, K447, m3699, m59, U, U100, U11, U113, U114, U115, U120, U122, U144, U149, U16615, U16, U169, U17, U170, U20, U234, U43, U44, U48, U53, U54, U64, U65, U66, U70, U78, U80, U84, U9, U95, U96, U99, U99c, U99m). Все используемые штаммы были первоначально проанализированы на устойчивость к антибиотикам для определения МИК. МИК определяли как наименьшую концентрацию (в мг/л) при соответствующем серийном разведении антибиотика, при которой ингибируется рост колоний бактерий. Все испытанные штаммы *S. aureus* были устойчивы к метициллину. Метициллин-резистентная инфекция *S. aureus* может быстро распространяться и приводить к высокой заболеваемости в больнице и смертности от неэффективного лечения.

Культуру бактерий выращивали на плотной питательной среде Mueller Hinton Agar (HiMedia). Бактерицидную активность определяли точечным методом. Для каждого тестируемого штамма готовили бактериальную взвесь в физиологическом растворе (9 г/л

NaCl) с концентрацией клеток  $10^9$  колониеобразующих единиц в мл (КОЕ/мл) по стандарту мутности. Затем взвеси бактерий разбавляли в 1000 раз, наносили по 100 мкл на плотную питательную среду и тщательно растирали по поверхности ватным тампоном. В течение 15 мин на все планшеты наносили 0,01 мл суспензии наночастиц, обработанных ультразвуком (15 мг/мл). Посевы культивировали при температуре 37°C в течение 24 часов. Антибактериальную активность оценивали по наличию и размеру зоны задержки роста вокруг места нанесения суспензии наночастиц. Все данные были представлены как среднее  $\pm$  стандартное отклонение. Каждый результат представляет собой среднее значение как минимум трех параллельных экспериментов.

### 5.2.2 Наночастицы на основе *h*-BN

Во-первых, для каждого штамма *E. coli* минимальные ингибирующие концентрации (МИК) для ампициллина (AMP), амоксициллина (AMC), цефотаксима (CTX), ципрофлоксацина (CIP), гентамицина (G), фосфомицина (FOS) и нитрофурантоина (NIT)) были определены. Результаты показывают, что среди 46 исследованных штаммов *E. coli* 41 является штаммом с множественной лекарственной устойчивостью. Для гентамицина, который используется в настоящем исследовании в качестве одного из загруженных антибактериальных агентов, значения МИК широко варьируют от 0,5 до 256 мг/л (таблица 13).

Бактерицидную активность чистых и нагруженных антибиотиками НЧ BN и BN/Ag оценивают путем анализа размера зоны ингибирования бактерий вокруг образцов (суспензии наночастиц). Чистый раствор гентамицина (с той же концентрацией (0,04 мг/мл), которая использовалась при загрузке его в образец BN-G4) является контролем. Полученные результаты показаны на рисунках 43-45 и обобщены в таблице 14. Чистые НЧ BN и чистый раствор гентамицина не оказывают заметного действия на грамположительные и грамотрицательные бактерии. Напротив, нагруженные гентамицином НЧ проявляют сильный бактерицидный эффект в отношении *S. aureus*, *P. aeruginosa* и многих штаммов *E. coli* (A19\*, ATCC25922\*, ATCC35218\*, C600\*, K353\*, K447\*, m3699\*, m59, U, U100\*, U113\*, U114\*, U115, U120\*, U144\*, U15, U166\*, U169\*, U17\*, U170\*, U20\*, U234\*, U43\*, U44\*, U48\*, U54\*, U64\*, U65\*, U66\*, U78\*, U80\*, U84\*, U9, U95\*, U99\*, U99c\*, U99m\*, в том числе с множественной лекарственной устойчивостью (отмечены звездочкой)). Поэтому важно, что даже образцы BN-G4 с минимальной нагрузочной дозой гентамицина (4 масс.%) проявляют значительный бактерицидный эффект.

В то же время нагруженные гентамицином НЧ ВN не эффективны в отношении *E. coli* A2498 (ампициллин-резистентные), A31 (ампициллин-, амоксициллин-, цефотаксим-, цiproфлоксацин- и гентамицин-резистентные), A917 (ампициллин-, амоксициллин-резистентные). - устойчивые к цефотаксиму и гентамицину), K261 (устойчивые к ампициллину, амоксициллину, цефотаксиму, цiproфлоксацину и гентамицину), U122 (устойчивые к ампициллину, амоксициллину, цефотаксиму, цiproфлоксацину и гентамицину) , U149 (резистентность к ампициллину, амоксициллину, цефотаксиму, цiproфлоксацину и гентамицину), U53 (резистентность к ампициллину, амоксициллину, цефотаксиму, цiproфлоксацину и гентамицину), U70 (резистентность к ампициллину, амоксициллину, цефотаксиму -, устойчивые к цiproфлоксацину и гентамицину) и штаммы U96 (устойчивые к ампициллину, амоксициллину, цефотаксиму, цiproфлоксацину и гентамицину) (таблица 13). Все эти штаммы (кроме A2498) обладают множественной лекарственной устойчивостью. Бактерицидная активность образцов ВN, нагруженных гентамицином, снижается с увеличением МИК гентамицина. Например, МИК для штаммов U114, U120 и U122 составляют 1, 2 и 256 г/л соответственно.

Таблица 13 – Минимальная ингибирующая концентрация (МИК) в мг/л для ампициллина (AMP), амоксициллина (AMC), цефотаксима (CTX), цiproфлоксацина (CIP), гентамицина (G), фосфомицина (FOS) и нитрофурантоина (NIT). Заполненные клетки демонстрируют устойчивость к антибиотикам

<i>E.coli</i>	AMP	AMC	CTX	CIP	G	FOS	NIT
K261	>256	256	64	0,5	128	4	>256
K353	>256	64	>256	<0,12	1	16	64
K447	>256	128	>256	128	0,5	>256	32
U	16	32	4	16	0,5	4	32
U9	16	4	<0,25	<0,25	<4	<4	64
U11	>256	32	256	32	<4	<4	<32
U15	<4	4	<0,25	<0,25	<4	8	<32
U17	256	32	<0,25	<0,25	<4	8	<32
U20	>256	16	<0,25	<0,25	<4	<4	<32
U43	>256	>256	>256	128	1	4	2
U44	>256	>256	>256	64	4	32	32
U48	>256	>256	>256	32	4	8	4
U53	>256	>256	>256	256	128	8	4
U54	>256	>256	>256	128	1	4	64
U64	>256	>256	>256	32	1	4	2

U65	>256	>256	>256	32	1	16	4
U66	>256	>256	128	<0,25	1	2	4
U70	>256	>256	>256	128	8	2	32
U78	>256	>256	>256	32	64	8	64
U80	>256	>256	>256	128	2	4	4
U166	>256	>256	>256	64	1	8	128
U84	>256	>256	>256	256	2	4	4
U95	>256	>256	>256	32	1	4	128
U96	>256	>256	>256	64	16	4	4
U99c	>256	>256	>256	32	1	2	16
U99m	>256	>256	>256	32	0,5	4	128
U100	>256	>256	>256	32	1	64	128
U113	>256	>256	128	128	1	8	64
U114	>256	>256	>256	<0,25	1	1	4
U115	8	32	0,5	<0,25	0,5	1	32
U120	>256	>256	>256	128	2	2	64
U122	>256	>256	>256	128	256	4	32
U144	>256	>256	>256	64	2	16	1
U149	>256	>256	>256	128	128	4	16
U169	>256	>256	>256	<0,25	1	32	2
U170	>256	>256	>256	0,5	1	128	64
A31	>256	>256	>256	64	64	2	32
A19	>256	>256	>256	32	0,5	8	32
A2498	16	8	0,5	<0,25	1	32	32
A917	>256	>256	>256	64	64	8	64
U234	>256	>256	>256	32	2	8	32
m3699E/17	>256	>256	>256	32	2	128	32
m59E/17	8	16	4	32	0,5	4	32

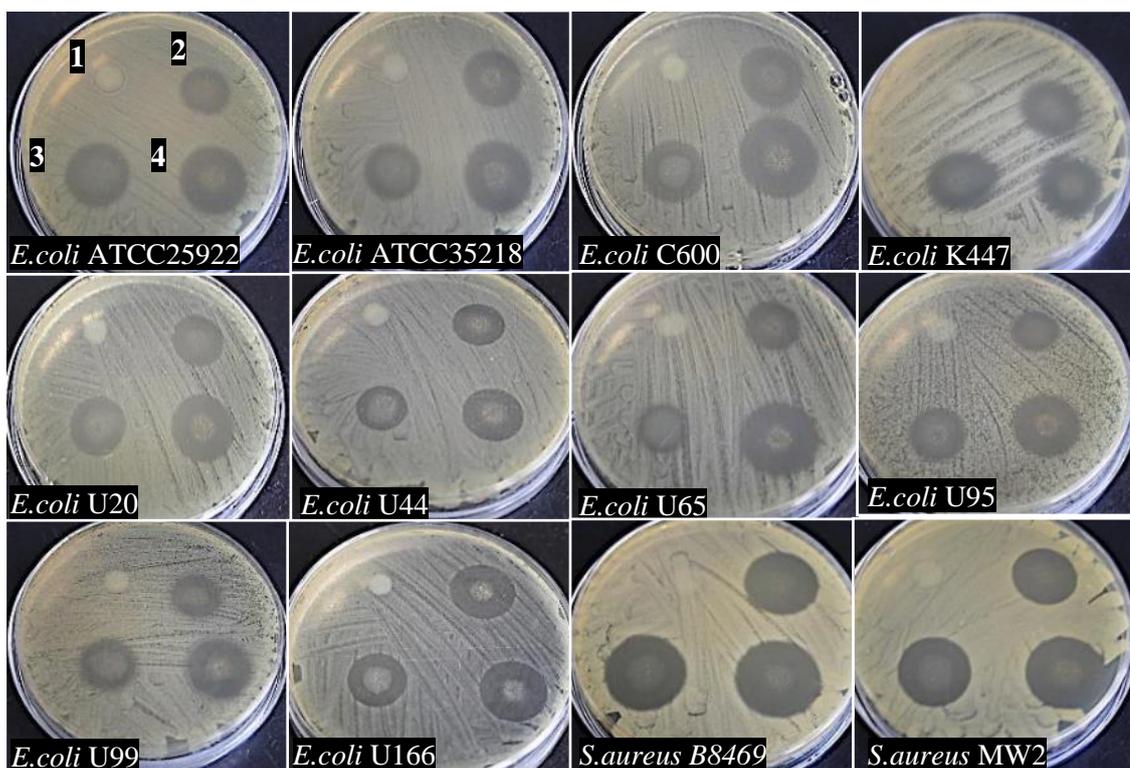


Рисунок 43 – Бактерицидная активность НЧ BN, нагруженных различным количеством гентамицина: 1 – чистый BN; 2 – BN-G4 (4 масс.%); 3 – BN-G6 (6 масс.%); 4 – BN-G8 (8 масс.%)

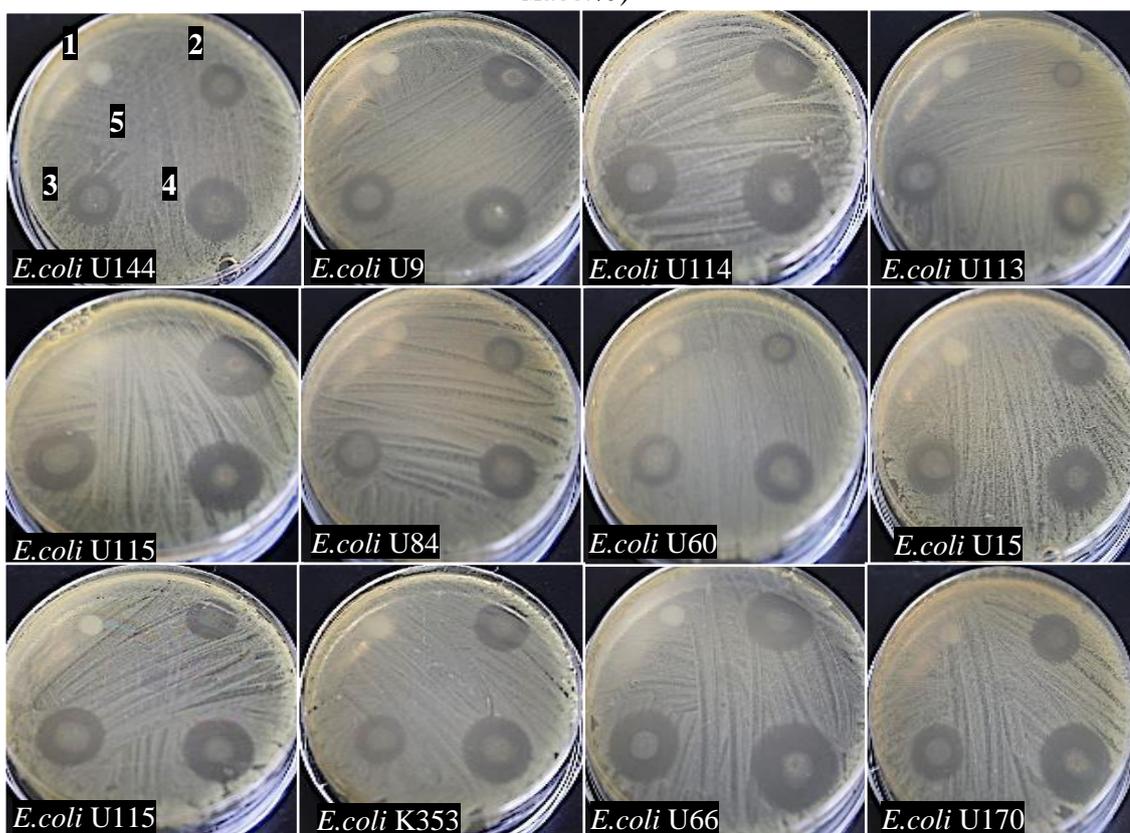


Рисунок 44 – Бактерицидная активность НЧ BN, нагруженных различным количеством гентамицина: 1 – BN; 2 – BN-G4 (4 масс.%); 3 – BN-G6 (6 масс.%); 4 – BN-G8 (8 масс.%); 5 – G = 0,04 мг/мл

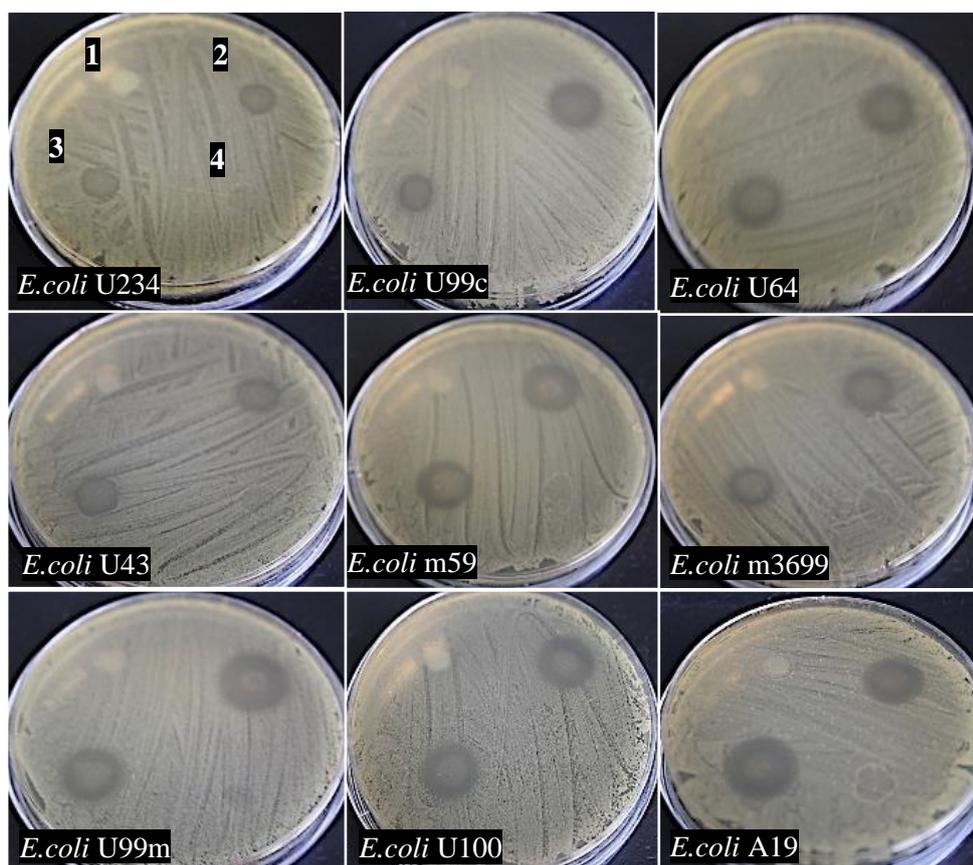


Рисунок 45 – Бактерицидная активность НЧ BN, нагруженных различным количеством гентамицина: 1 – BN; 2 – BN-G4 (4 масс. %); 3 – BN-G6 (6 масс. %); 4 – G = 0,04 мг/мл

Были проведены дополнительные тесты для оценки бактерицидного эффекта ионов  $Ag^+$ , вымываемых из нагруженных антибиотиками и не содержащих антибиотики НЧ BN/ $Ag$ , против этих устойчивых к гентамицину штаммов (рисунок 46). Бактериальные штаммы *S. aureus* MW2, *E. coli* U20 и *E. coli* U78 также были включены в тесты для выявления возможного синергетического действия ионов  $Ag^+$  и гентамицина. Результаты показывают, что ионы  $Ag^+$  эффективно ингибируют рост штаммов *E. coli* A2498, A31, A917, K261, U122, U149, U53, U70 и U96. Более того, бактерицидная активность образца BN/ $Ag$ -G4 в отношении штаммов *E. coli* U20 и U78 значительно выше по сравнению с его аналогом, не содержащим антибиотиков, что свидетельствует о синергическом действии гентамицина и ионов  $Ag^+$ . В случае грамположительных бактерий *S. aureus* ионы  $Ag^+$  не действуют на штамм MW2, а гентамицин действует (таблица 14).

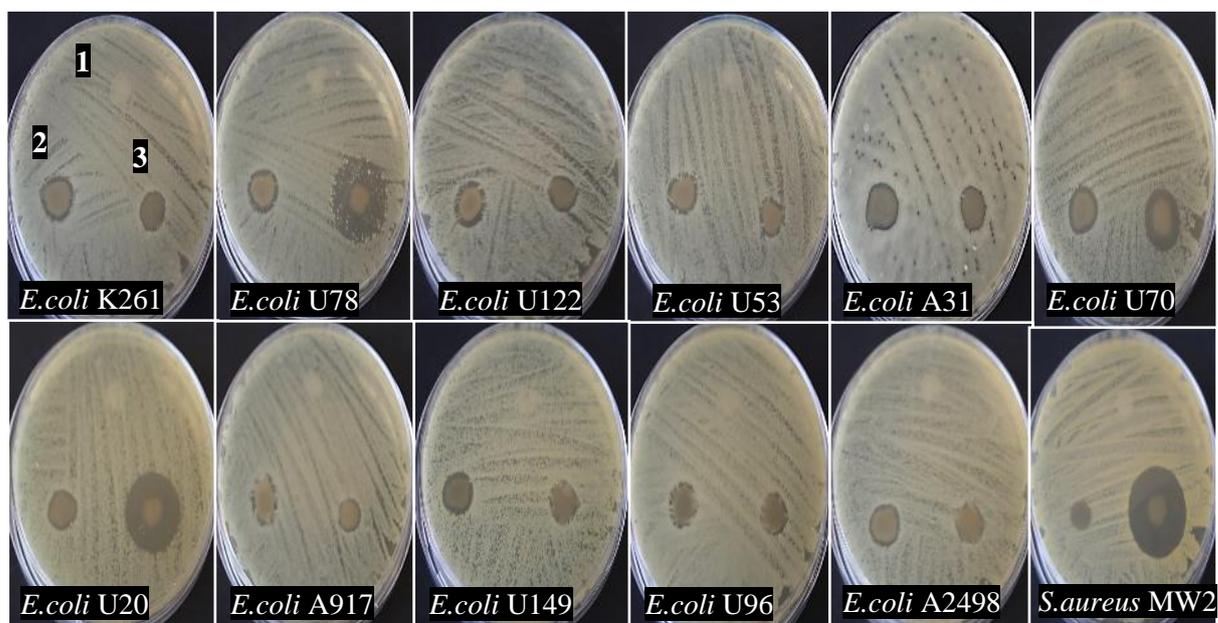


Рисунок 46 – Бактерицидная активность НЧ BN (1), BN/Ag (2) и BN/Ag -G4 (3)

Полученные результаты свидетельствуют о том, что даже в пределах одного рода госпитальных бактерий *E. coli* существует множество штаммов, различающихся по антибиотикорезистентности. Нагруженные антибиотиками НЧ BN проявляют бактерицидную активность в отношении примерно 80% штаммов. Для остальных 20% эффективны наногбриды BN/Ag. Таким образом, использование нагруженных антибиотиками НЧ BN/Ag обеспечивает широкую бактерицидную защиту от всех изученных патогенов.

Таблица 14 – Бактерицидная активность наночастиц, определенная точечным методом

Тип бактерии	Штамм	Зона ингибирования, мм					
		BN	BN-G4	BN-G6	BN-G8	BN/Ag	BN/Ag-G4
<i>Staphylococcus aureus</i>	B8469	0	22	22	24	-	-
	MW2	0	20	21	22	0	25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC27853	0	10	10	12	-	-
	B1307/17	0	12	10	11	-	-
<i>Escherichia coli</i>	A19	halo*	12	14	-	-	-
	A2498	halo	spot**	spot	-	13	12
	A31	0	spot	spot	-	13	11
	A917	0	0	0	0	11	10
	ATCC25922	1	16	19	20	-	-

---

ATCC35218	0	19	16	20	-	-
C600	0	20	17	23	-	-
K261	halo	-	-	-	14	11
K353	0	10-17	14	18	-	-
K447	0	17	16	16	-	-
m3699	halo	13	11	-	-	-
m59	halo	16	15	-	-	-
U	0	16	17	18	-	-
U100	0	16	15	-	-	-
U11	halo	15	-	-	-	-
U113	0	10-17	14-16	13-17	-	-
U114	0	19	19	22	-	-
U115	0	15-21	18	19	-	-
U120	0	11	11	10	-	-
U122	0	0	0	spot	13	12
U144	0	9-14	14	17	-	-
U149	0	spot	spot	spot	12	13
U15	0	17	13	15-17	-	-
U166	0	20	17	19	-	-
U169	0	14	14	17	-	-
U17	0	19	18	-	-	-
U170	0	14-16	14	20	-	-
U20	1	13-17	17	19	12	22
U234	0	10	8-11	-	-	-
U43	halo	11	11	-	-	-
U44	1	16	14	17	-	-
U48	0	14-16	16	-	-	-
U53	0	0	0	0	12	10
U54	0	15	13-15	-	-	-
U64	halo	14	13	-	-	-
U65	0	8-15	13	20	-	-
U66	0	16-20	18	22	-	-
U70	halo	spot	spot	-	13	16
U78	0	19	18	-	13	22
U80	0	11	15	16	-	-

---

U84	halo	10-12	14	16	-	-
U9	0	15-18	14	15	-	-
U95	0	14	15	19	-	-
U96	0	spot	spot	spot	12	12
U99	1-2	16	16	18	-	-
U99c	0	14	8	-	-	-
U99m	0	11-17	14	-	-	-

\*halo – слабое ингибирование роста бактерий на внешнем крае пятна

\*\*spot – слабое ингибирование роста бактерий в области пятна

### 5.2.3 Визуализация взаимодействия наночастиц с бактерией

ПЭМ изображения клеток *E. coli* после их инкубации в суспензиях, не содержащих BN (контрольный образец), и суспензиях, допированных BN-G4 и BN/Ag, представлены на рисунке 47. Контрастность клеток связана с целостностью бактерий и изменяется от темного гомогенного контраста (рисунок 47а), характерного для живой клетки, до неоднородного контраста по бокам и концам (рисунок 47б, в), указывающего на разрушение клеток.

СЭМ микрофотография клетки *E. coli* демонстрирует типичную интактную морфологию колбасовидной формы (рисунок 47г). После инкубации с НЧ BN/Ag клеточная стенка бактерий *E. coli* частично разрушается. На СЭМ изображении видно повреждение клеточной стенки и деструкция в полярной области клетки (рисунок 47д), а также распад и смещение слоев клеточной стенки (рисунок 47е). Клетка *E. coli*, находящаяся в прямом контакте с НЧ BN, украшенная НЧ Ag, показана на рисунок 47ж. Видно, что НЧ каким-то образом повреждают клеточную стенку. В соседней области наблюдается отверстие, свидетельствующее о повреждении верхней части бактериальной стенки (показано пунктиром). После инкубации с НЧ BN-G4 видна клетка *E. coli* с выраженными зонами лизиса на верхнем конце и в середине клетки (рисунок 47з).

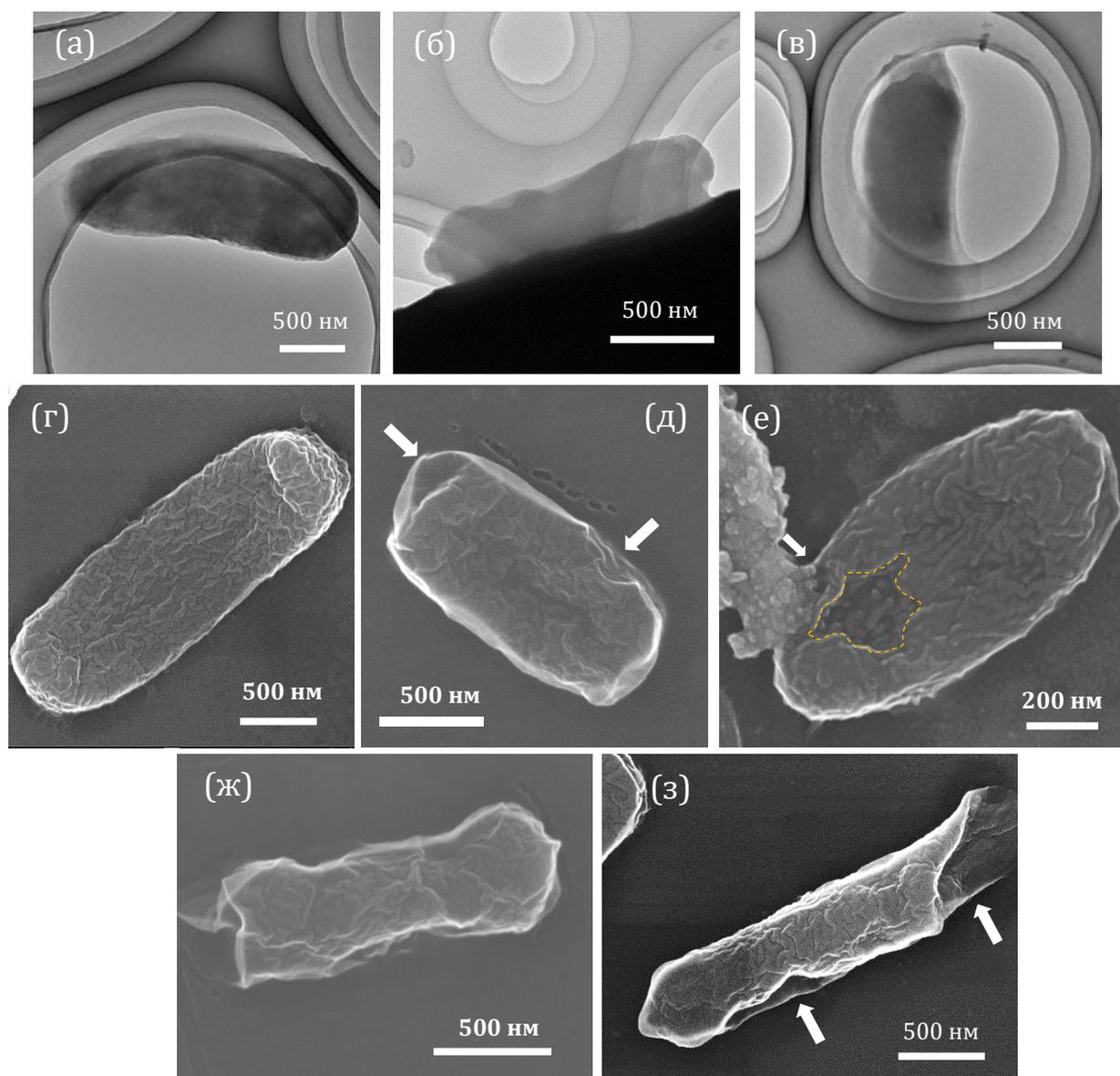


Рисунок 47 - ПЭМ (а-в) и СЭМ (г-з) - изображения бактерий после их инкубации в суспензиях без НЧ BN (а, г), с НЧ BN-G4 (б, з) и BN/Ag (в, д-ж). Участки разрушения клеточных стенок показаны стрелками

ЭДС-карты состава показывают некоторое количество бора и азота на поверхности *E. coli* в результате взаимодействия клетки/BN-G4 (рисунок 48а). Агломерат НЧ BN/Ag в прямом контакте с клеткой *E. coli* показан на рисунке 48б. Присутствие Ag рядом с клеткой хорошо подтверждается анализом ЭДС.

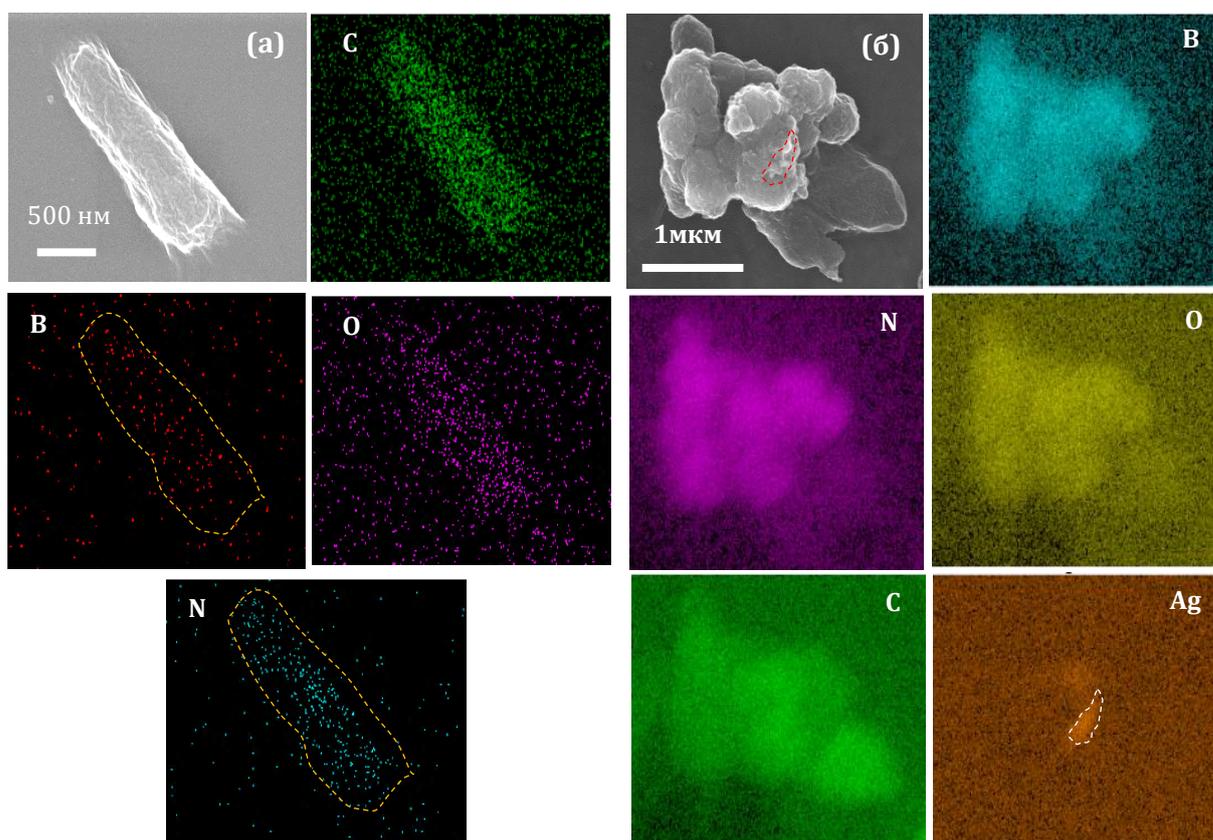


Рисунок 48 - СЭМ-изображения клеток *E. coli* с соответствующими ЭДС-картами элементов после их инкубации в суспензиях с НЧ BN-G4 (а) и BN/Ag (б)

### 5.3 Исследование фунгицидных свойств покрытий

#### 5.3.1 Методика исследования фунгицидных свойств

Фунгицидную активность образцов изучали в отношении штамма дикого типа wt-987 и мутантов nit-2 (без нитрита и нитратредуктазы) и nit-6 (без нитритредуктазы) спор *N. crassa* (Fungal Genetics Stock Center, США). Концентрация суспензии конидий (вегетативных спор), хранившихся при  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , составляла 30 мг/мл. 0,3 мл суспензии спор *N. crassa* прикапывали на поверхность 2%-ной агаровой среды Фогеля в стерильных чашках Петри. Покрытые BN и загруженные антибиотиками Si-планшеты помещали лицевой стороной вниз на среду для выращивания с равномерно распределенной суспензией спор и инкубировали при  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение 24 часов. Степень антифунгальной активности оценивали по диаметру зоны ингибирования грибов вокруг образца (агаро-диффузионный тест).

### 5.3.2 Наноструктурированные покрытия на основе *h*-BN

Результаты диффузионных испытаний в агаре образцов, нагруженных антибиотиками, против штамма wt-987 и мутантов nit-2 и nit-6 аскомицета *N. crassa* представлены на рисунке 49 и таблице 15. Пленка и фильтр BN, нагруженные гентамицином, а также два других контрольных образца (чистые BN и Si) оказались неэффективными в отношении спор *N. crassa*. Напротив, пленки G<sub>150</sub>-A<sub>100</sub>/BN и G<sub>300</sub>-A<sub>100</sub>/BN эффективно ингибировали рост мицелия *N. crassa* wt-987 и его мутантов nit-2 и nit-6 с нарушенным метаболизмом азота. Обратите внимание, что этот вид грибов характеризуется прочными клеточными стенками, выступающими в качестве барьера против бактерицидных ионов металлов, что делает их использование менее эффективным. Присутствие гентамицина не влияет на фунгицидную активность амфотерицина В.

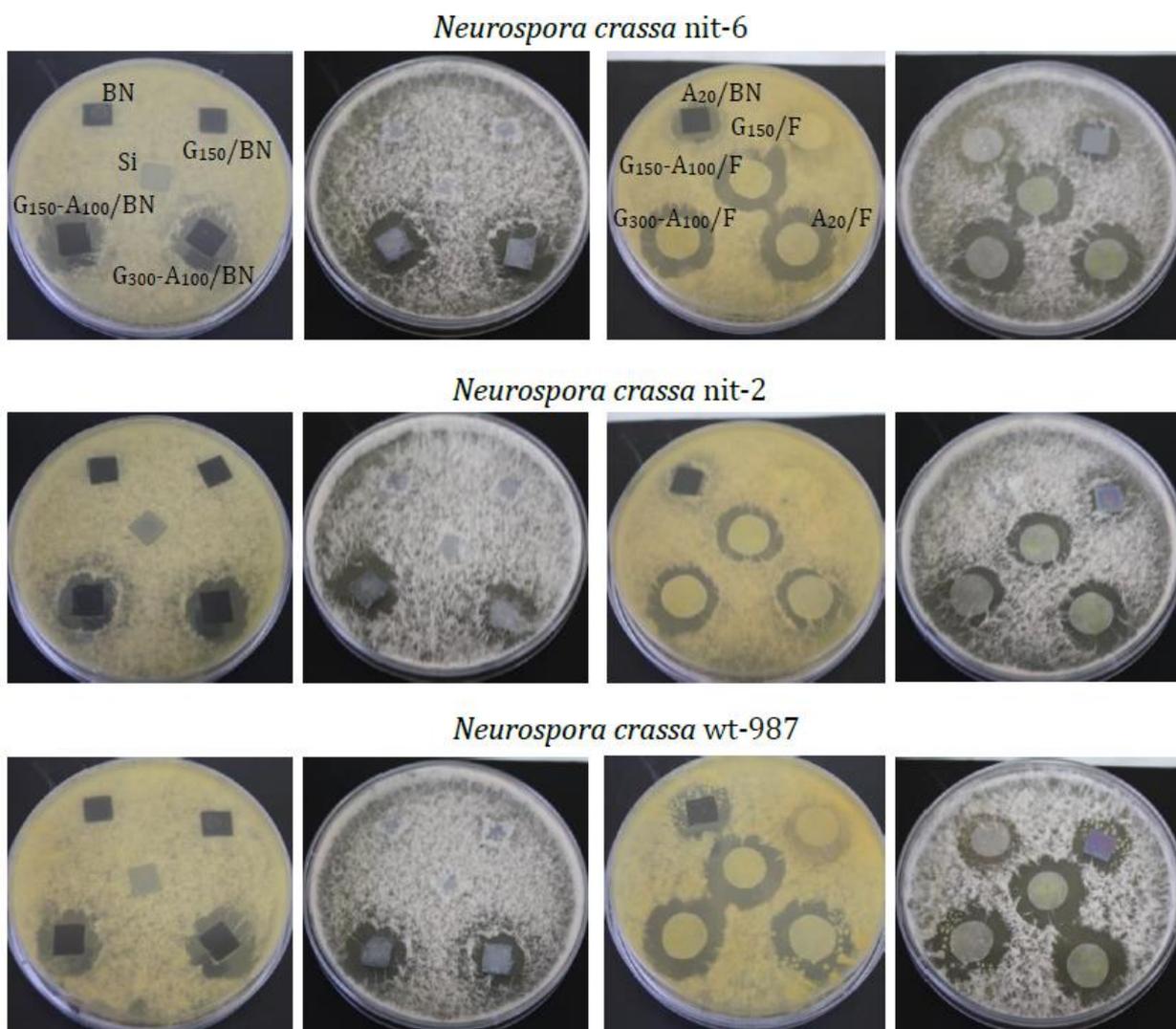


Рисунок 49 – Зоны ингибирования грибов

Таблица 15 – Зоны ингибирования грибов

Образец	Диаметр зоны ингибирования, мм		
	<i>Neurospora crassa</i> NIT6	<i>Neurospora crassa</i> NIT2	<i>Neurospora crassa</i> wt987
BN	0	0	0
Si	0	0	0
G <sub>150</sub> /BN	0	0	0
G <sub>150</sub> /F	0	0	0
A <sub>20</sub> /BN	19	19	20
A <sub>20</sub> /F	25	21	24
G <sub>150</sub> -A <sub>100</sub> /BN	22	20	21
G <sub>300</sub> -A <sub>100</sub> /BN	23	21	18
G <sub>150</sub> -A <sub>100</sub> /F	24	23	25
G <sub>300</sub> -A <sub>100</sub> /F	24	22	25

Для оценки фунгицидной активности покрытий на основе *h*-BN (рисунок 50) образцы BN и BN/Amp были помещены в суспензии спор *N. crassa* дикого типа *wt*-987, мутанта, дефектного по основному азотрегулирующему гену *nit*-2, и мутанта по ассимилирующему структурному гену нитритредуктазы *nit*-6. Согласно полученным результатам образцы BN/Amp эффективно подавляют рост всех трех видов культур.

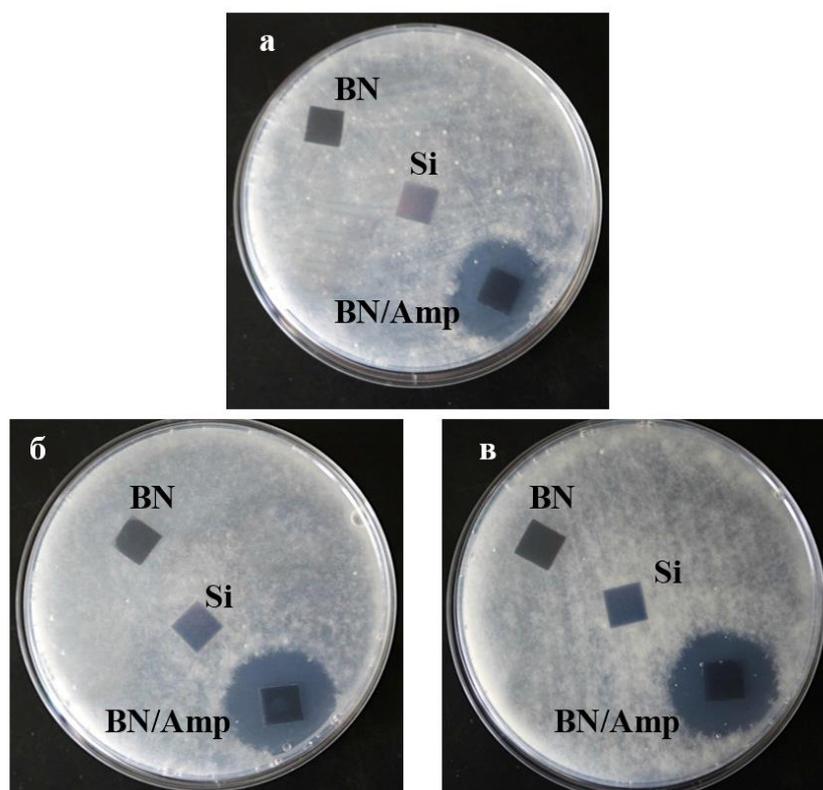


Рисунок 50 - Зона подавления роста бактерий аскомицета *N. crassa* wt-987 (а), *N. crassa* nit-2 (б) и *N. crassa* nit-6 (в) вокруг образцов покрытий BN, BN/Amp и Si (контроль)

## 5.4 Исследование фунгицидных свойств наночастиц

### 5.4.1 Методика исследования фунгицидных свойств

Для изучения фунгицидной активности использовали различные культуры грибов: *Candida albicans* (кандидоз-молочница) ATCC90028 и ATCC24433, *Candida parapsilosis* ATCC90018, *Candida auris* CBS109113 и *Neurospora crassa* wt. 0,2 мл суспензии спор с концентрацией 30 мг/мл наносили на стерильную чашку Петри, содержащую твердую питательную среду Mueller Hinton Agar (HiMedia), и распределяли шпателем. В течение 15 минут на все планшеты наносили 0,01 мл суспензии наночастиц, обработанных ультразвуком. Культуры культивировали при температуре 37°C в течение 24 часов. Степень антифунгальной активности оценивали по диаметру зоны ингибирования роста грибов вокруг образца (диффузионный тест в агаре).

### 5.4.2 Наночастицы h-BN

Фунгицидная инфекция представляет серьезную угрозу для организма. Высокий риск заражения *C. parapsilosis* часто связан с имплантированными медицинскими устройствами, такими как катетеры, протезы и искусственные клапаны сердца [255]. Было доказано, что дрожжи хорошо растут на поверхности искусственных имплантатов. *C. auris* — это новый грибок, который представляет серьезную угрозу для здоровья во всем мире. Он обладает повышенной устойчивостью к доступным в настоящее время противогрибковым препаратам [256].

Результаты диффузионных испытаний в агаре чистого и нагруженного амфотерицином В BN и BN/Ag показаны на рисунке 51 и обобщены в таблице 16. Образцы чистого BN не оказывают влияния на *C. albicans*, *C. auris*, *C. parapsilosis* и грибы *N. crassa*. В то же время все НЧ BN, нагруженные амфотерицином В, проявляют выраженный фунгицидный эффект. Доказана эффективность даже образцов BN-A1 с минимальной концентрацией антибиотика. Систематической зависимости фунгицидной активности образца от дозы антибиотика не наблюдается, хотя в случае *N. crassa* отмечается более сильный эффект при более высоком содержании амфотерицина В.

Таблица 6 – Фунгицидная активность наночастиц, определенная тестами на диффузию в агар

Тип грибов	Штамм	Диаметр зоны ингибирования, мм					
		BN	BN-A1	BN-A2	BN-A3	BN/Ag	BN/Ag - A1
<i>Candida albicans</i>	ATCC24433	0	8	8	10	23	26
	ATCC90028	halo*	8	7	8	25	32
<i>Candida auris</i>	CBS109113	0	12	10	9	22	10
<i>Candida parapsilosis</i>	ATCC90018	halo	11	9	8	18	16
<i>Neurospora crassa</i>	wt	0	13	13	17	30	24

\*halo - слабое ингибирование роста грибка по внешнему краю пятна

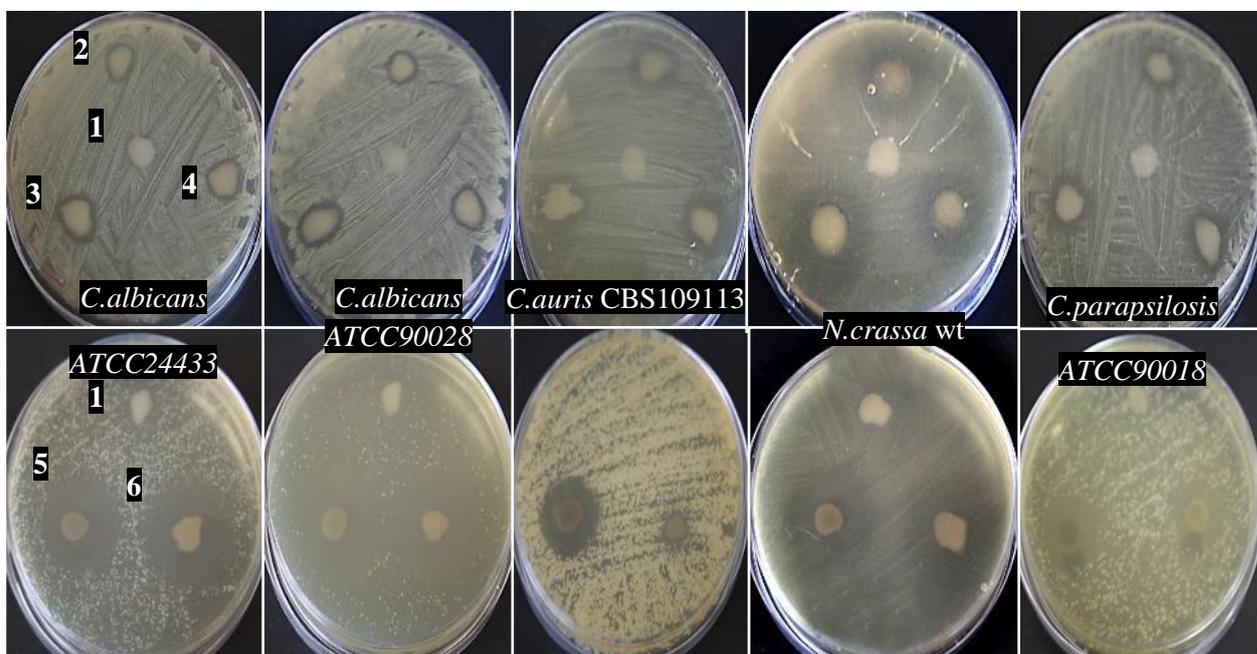


Рисунок 51 – Фунгицидная активность НЧ: 1 – BN; 2 – BN-A1; 3 – BN-A2; 4 – BN-A3; 5 – BN/Ag; 6 – BN/Ag -A1

В случае образцов BN/Ag размер зоны ингибирования грибов увеличивается в 2-3 раза по сравнению с наногридами BN-A без Ag за счет выделения ионов Ag<sup>+</sup>. Дальнейшее насыщение BN/Ag амфотерицином В по-разному влияет на фунгицидную активность: размер зоны угнетения гриба либо увеличивается (*C. albicans*), либо уменьшается (*C. auris*, *C. parapsilosis*, *N. crassa*). Подводя итоги, отметим, что как BN/Ag, так и нагруженные амфотерицином В наногриды BN/Ag проявляют высокую фунгицидную активность в отношении клеток *C. albicans*, *C. auris*, *C. parapsilosis* и *N. crassa*.

## ВЫВОДЫ

1. Методом химического осаждения из газовой фазы получены наноструктурированные покрытия *h*-BN, обладающие высокой сорбционной способностью в отношении различных терапевтических препаратов. Методами ИК-спектроскопии и РФЭС, а также путем измерения краевого угла смачивания показано, что покрытия *h*-BN были успешно насыщены гентамицином (150 и 300 мкг/см<sup>2</sup>) и амфотерицином В (20 и 100 мкг/см<sup>2</sup>). Показано, что высвобождение антибиотиков из покрытий в буферный раствор происходит в течение длительного промежутка времени, зависящего от дозы загрузки, и может достигать 11 дней. Образцы показывают быстрое растворение поверхностно-связанного терапевтического препарата и его дальнейшее пролонгированное высвобождение. Биологические испытания показали, что образцы, насыщенные гентамицином, эффективно подавляют рост устойчивого к антибиотикам штамма *E. coli* К-261 и штамма *Bacillus F*, выделенного из вечной мерзлоты. Образец, насыщенный амфотерицином В, оказывает фунгицидное действие против различных типов штамма аскомицета *Neurospora crassa*. Для более широкой защиты от бактерицидной и фунгицидной инфекций, пленки BN насыщали смесью гентамицина (150 и 300 мкг/см<sup>2</sup>) и амфотерицина В (100 мкг/см<sup>2</sup>). Все образцы продемонстрировали выраженный и продолжительный бактерицидный эффект в отношении штамма *E. coli* 261 (уменьшение количества КОЕ на 99 %) и эффективно ингибировали рост мицелия *N. crassa* – дикого типа *wt*-987 и его мутантов *nit*-2 и *nit*-6. Гентамицин и амфотерицин В не оказывают негативного влияния друг на друга при проведении бактерицидных и фунгицидных тестов.

2. Впервые продемонстрировано, что граммотрицательные устойчивые к антибиотикам бактерии кишечной палочки погибают в результате их механического повреждения при контакте с наноструктурированной поверхностью покрытия *h*-BN, состоящей из наноигл и нанопластин. Показано, что бактерицидный эффект наночастиц *h*-BN (снижение колоний-образующих элементов (КОЕ) на 99,99% при исходной концентрации клеток кишечной палочки 10<sup>4</sup> клеток/мл и на 90% при 10<sup>6</sup> клеток/мл) сопоставим с токсическим эффектом от гентамицина, высвобождающегося из наночастиц *h*-BN при его минимальной ингибирующей концентрации (150 мг/л).

3. Получены сферические полые наночастицы гексагонального BN со средним размером ~100 нм, которые были использованы в качестве перспективных носителей бактерицидных и фунгицидных агентов (наночастицы Ag, антибиотики, противогрибковые средства). На основе измерения дзета потенциала и размера

наночастиц *h*-BN и *h*-BN/Ag, а также значений минимальной ингибиторной концентрации антибиотиков, определены оптимальные концентрации загружаемого в наночастицы гентамицина и амфотерицина В. Успешная загрузка терапевтических компонентов в полые наночастицы *h*-BN была подтверждена методами РФЭС и ИК спектроскопии с преобразованием Фурье. Показано, что количество терапевтического агента, выходящего из наночастиц *h*-BN и *h*-BN/Ag в фосфатно-солевой буферный раствор, зависят от дозы загрузки: чем выше доза, тем выше концентрация и более продолжительный выход. Быстрый выход ионов  $\text{Ag}^+$  из образцов *h*-BN/Ag в течение первых нескольких часов сменяется более медленным высвобождением ионов в течение следующих нескольких дней. Биологические испытания показали, что наночастицы *h*-BN с минимальной загрузочной дозой гентамицина (4 мас. %) проявляют сильный бактерицидный эффект в отношении 2 видов штамма *S.aureus*, 2 видов штамма *P. aeruginosa* и 38 видов штамма *E. coli*, включая штаммы, обладающие множественной лекарственной устойчивостью. В отношении остальных протестированных штаммов *E. coli*, наночастицы *h*-BN, легированные Ag, и гибридные наночастицы *h*-BN/Ag, насыщенные с гентамицином, продемонстрировали превосходную бактерицидную активность. Также установлена высокая фунгицидная активность нагруженных амфотерицином В наночастиц BN и *h*-BN/Ag, а также наногридов *h*-BN/Ag против бактериальных штаммов *C. albicans*, *C. auris*, *C. parapsilosis* и грибов *N. crassa*.

4. Гибридные покрытия *h*-BN/Ag и *h*-BN/Fe были успешно получены путем взаимодействия газообразного аммиака с прекурсором аморфного бора при 1300°C с последующим термическим разложением  $\text{AgNO}_3$  при 350 °C или восстановлением  $\text{FeCl}_3$  в водороде при 350 °C. Наноструктурированные покрытия *h*-BN состояли из сферических наночастиц *h*-BN размером 100–300 нм, поверхность которых образована многочисленными нанолепестками *h*-BN, и были либо покрыты ультрадисперсными наночастицами серебра размером 2-6 нм, либо наночастицами/пленкой оксида железа. Показано, что серебро на поверхности покрытий *h*-BN находится в металлическом состоянии, а железо - в окисленном, образуя наночастицы/пленку  $\gamma\text{-Fe}_3\text{O}_4$  и  $\epsilon\text{-Fe}_2\text{O}_3$ . Поверхностная модификация покрытий *h*-BN наночастицами улучшает смачиваемость. Количество высвобождаемых ионов Ag и Fe зависит от концентрации серебра и оксида железа. Быстрое начальное выделение ионов Ag и Fe в первые 3 ч сменяется более медленным выщелачиванием в последующие 21 ч. После УФ-облучения в течение 1 часа покрытия *h*-BN/Ag и *h*-BN/Fe генерируют активные формы кислорода концентрация которых постепенно увеличивается через 24 ч. Показано, что бактерицидный эффект зависит от концентрации Ag и оксида железа и специфичен для каждого типа бактерий и

грибковых культур. Биологические испытания показали, что минимальная ингибирующая концентрация (МИК) оксида железа составляет 74 мкг/см<sup>2</sup> для эффективного подавления бактериальных штаммов *E. coli* K-261, *E. coli* U20, *S. aureus* MW2, *S. aureus* 839 и *S. pneumoniae* ATCC33400 и грибковой культуры *C. parapsilosis* ATCC90018 через 24 часа. Покрытия *h*-VN/Ag проявляют сильный бактерицидный эффект при более низкой концентрации Ag по сравнению с оксидом железа. Образец с 25 мкг/см<sup>2</sup> серебра полностью уничтожает штаммы *E. coli* K-261, *E. coli* U20 и *S. aureus* MW2 через 3 часа и эффективно ингибирует рост штаммов *S. aureus* ATCC25923, *C. parapsilosis* ATCC90018, *E. coli* C600, *C. auris* CBS10913 и *S. pneumoniae* ATCC33400. МИК серебра составляет 12 мкг/см<sup>2</sup> для полного подавления штаммов *E. coli* K-261, *E. coli* U20, *S. aureus* MW2 и *S. aureus* 839 через

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Shtansky, D.V.; Levashov, E.A.; Batenina, I.V.; Gloushankova, N.A.; Anisimova, N.Y.; Kiselevsky, M.V.; Reshetov, I.V. Recent Progress in the Field of Multicomponent Bioactive Nanostructured Films, *RCS Adv.* **2013**, *3*, 11107-11115
- 2 Salwiczek, M.; Qu, Y.; Gardiner, J.; Strugnell, A.R.; Lithgow, T.; McLean, M.K.; Thissen, H. Emerging rules for effective antimicrobial coatings. *Trends Biotechnol.* **2014**, *32(2)*, 82-90
- 3 Green, J-B.D.; Fulghum, T.; Nordhaus, A.M. Review of immobilized antimicrobial agents and methods for testing. *Biointerphases.* **2011**, *6(4)*, CL2-43
- 4 Banerjee, I.; Pangule, R.C.; Kane, R.S. Antifouling coatings: recent developments in the design of surfaces that prevent fouling by proteins, bacteria, and marine organisms. *Adv Mater.* **2011**, *23(6)*, 690-718
- 5 Tiller, J.C.; Liao, C.J.; Lewis, K.; Klibanov, A.M. Designing surfaces that kill bacteria on contact. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2001**, *98(11)*, 5981-5
- 6 Lewis, K., Klibanov, A. M. Surpassing nature: rational design of sterile-surface materials. *Trends in Biotechnology*, 2015, *23(7)*, 343–348
- 7 Linklater, D.P.; Nguyen, H.K.D.; Bhadra, C.M.; Juodkazis, S.; Ivanova, E.P. Influence of Nanoscale Topology on Bactericidal Efficiency of Black Silicon Surfaces, *Nanotechnology* **2017**, *28*, 245301
- 8 Al-Jumaili, A.; Alancherry, S.; Bazaka, K.; Jacob, M.V. Review on the Antimicrobial Properties of Carbon Nanostructures, *Materials (Basel)* **2017**, *10*, 1066
- 9 Linklaater, D.P.; De Volder, M.; Baulin, V.A.; Wermer, M.; Jessl, S.; Golozar, M.; Maggini, L.; Rubanov, S.; На физиологический растворен, E.; Juodkazis, S.; Ivanova, E.P. High Aspect Ratio Nanostructures Kill Bacteria Via Storage and Release of Mechanical Energy, *ACS Nano* **2018**, *12*, 6657-6667
- 10 Zanni, E.; Bruni, E.; Chandraiaghari, C.R.; De Bellis, G.; Santangelo, M.G.; Leone, M.; Bregnocchi, A.; Mancini, P.; Sarto, M.S.; Uccelletti, D. Evaluation of the Antibacterial Power and Biocompatibility of Zinc Oxide Nanorods Decorated Graphene Nanoplatelets: New Perspectives for Antibiodeteriorative Approaches, *Nanotechnol.* **2017**, *15*, 57

- 11 Shahmiri, M.; Ibrahim, N.A.; Shayesteh, F.; Asim, N.; Motallebi, N. Preparation of PVP-Coated Copper Oxide Nanosheets as Antibacterial and Antifungal Agents, *J. Mater. Res.* **2013**, *28*, 3109-3118
- 12 Ivanova, E.P.; Hasan, J.; Webb, H.K.; Gervinskas, G.; Juodkazis, S.; Truong, V.K.; Wu, A.H.F.; Lamb, R.N.; Baulin, V.A.; Watson, G.S.; Watson, J.A.; Mainwaring, D.E.; Crawford, R.J. Bactericidal Activity of Black Silicon. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 2838
- 13 Blümmel, J.; Perschmann, N.; Aydin, D.; Drinjakovic, J.; Surrey, T.; Lopez-Garcia, M.; Kessler, H.; Spatz, J. P. Protein repellent properties of covalently attached PEG coatings on nanostructured SiO<sub>2</sub>-based interfaces. *Biomaterials.* **2007**, *28*(32), 4739-4747
- 14 Roosjen, A., de Vries, J., van der Mei, H. C., Norde, W., Busscher, H. J. Stability and effectiveness against bacterial adhesion of poly(ethylene oxide) coatings in biological fluids. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 2005, *73B*(2), 347–354
- 15 Friedlander, R. S., Vlamakis, H., Kim, P., Khan, M., Kolter, R., Aizenberg, J. Bacterial flagella explore microscale hummocks and hollows to increase adhesion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2013, *110*(14), 5624–5629
- 16 Variola, F., Francis-Zalzal, S., Leduc, A., Barbeau, J., Nanci, A. Oxidative nanopatterning of titanium generates mesoporous surfaces with antimicrobial properties. *International Journal of Nanomedicine*, 2014, 2319
- 17 Campoccia, D.; Montanaro, L.; Arciola, C.R. A review of the biomaterials technologies for infection-resistant surfaces. *Biomaterials.* **2013**, *34*(34), 8533–8554
- 18 Godoy-Gallardo, M.; Eckhard, U.; Delgado, L.M.; de Roo Puente, Y.J.D.; Hoyos-Nogués, M.; Gil, F.J.; Perez, R.A. Antibacterial approaches in tissue engineering using metal ions and nanoparticles: From mechanisms to applications. *Bioact Mater.* **2021**, *6*(12), 4470-4490
- 19 Feng, Q.L.; Wu, J.; Chen, G.Q.; Cui, F.Z.; Kim, T.N.; Kim, J.O. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J. Biomed. Mater. Res.* **2000**, *52*, 662-668
- 20 Dowling, D.; Betts, A.; Pope, C.; McConnell, M.; Eloy, R.; Arnaud, M. Anti-bacterial silver coatings exhibiting enhanced activity through the addition of platinum. *Surf. Coat. Technol.* **2003**, *163-164*, 637-640

- 21 Tiller, J.C. Antimicrobial surfaces. In *Bioactive Surfaces*, 2011, 193–217
- 22 Kohanski MA, Dwyer DJ, Hayete B, Lawrence CA, Collins JJ. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell*. 2007 Sep 07;130(5):797-810
- 23 Zgur-Bertok D. DNA damage repair and bacterial pathogens. *PLoS Pathog.* (2013) 9:e1003711
- 24 Bhagyaraj E, Tiwari D, Ahuja N, Nanduri R, Saini A, Kalra R, et al. A human xenobiotic nuclear receptor contributes to nonresponsiveness of *Mycobacterium tuberculosis* to the antituberculosis drug rifampicin. *J Biol Chem.* (2018) 293:3747–57
- 25 Tipper DJ. Mode of action of beta-lactam antibiotics. *Pharmacol Ther.* 1985;27(1):1-35
- 26 Gerding DN, Sambol SP, Johnson S. Non-toxigenic *Clostridioides* (Formerly *Clostridium*) *difficile* for Prevention of *C. difficile* Infection: From Bench to Bedside Back to Bench and Back to Bedside. *Front Microbiol.* 2018;9:1700
- 27 Chopra, I., & Roberts, M. (2001). *Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65(2), 232–260
- 28 Campoccia, D., Montanaro, L., Arciola, C. R. A review of the biomaterials technologies for infection-resistant surfaces. *Biomaterials*, 2013, 34(34), 8533–8554
- 29 Lohner, K., and Prossnigg, F. (2009). Biological activity and structural aspects of PGLa interaction with membrane mimetic systems. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1788, 1656–1666
- 30 Shenkarev, Z. O., Balandin, S. V., Trunov, K. I., Paramonov, A. S., Sukhanov, S. V., Barsukov, L. I., et al. (2011). Molecular mechanism of action of  $\beta$ -hairpin antimicrobial peptide arenicin: oligomeric structure in dodecylphosphocholine micelles and pore formation in planar lipid bilayers. *Biochemistry* 50, 6255–6265
- 31 Corrêa, J. A. F., Evangelista, A. G., Nazareth, T. D. M., and Luciano, F. B. (2019). Fundamentals on the molecular mechanism of action of antimicrobial peptides. *Materialia* 8:100494

32 Lyu, Y., Fitriyanti, M., and Narsimhan, G. (2019). Nucleation and growth of pores in 1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC) / cholesterol bilayer by antimicrobial peptides melittin, its mutants and cecropin P1. *Colloids Surf. B Biointerf.* 173, 121–127

33 Li, L., Sun, J., Xia, S., Tian, X., Cheserek, M. J., and Le, G. (2016). Mechanism of antifungal activity of antimicrobial peptide APP, a cell-penetrating peptide derivative, against *Candida albicans*: intracellular DNA binding and cell cycle arrest. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 3245–3253

34 Helmerhorst, E. J., Troxler, R. F., and Oppenheim, F. G. (2001). The human salivary peptide histatin 5 exerts its antifungal activity through the formation of reactive oxygen species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 14637–14642

35 He, S.-W., Zhang, J., Li, N.-Q., Zhou, S., Yue, B., and Zhang, M. (2017). A TFPI-1 peptide that induces degradation of bacterial nucleic acids, and inhibits bacterial and viral infection in half-smooth tongue sole, *Cynoglossus semilaevis*. *Fish Shellf. Immunol.* 60, 466–473

36 Le, C. F., Gudimella, R., Razali, R., Manikam, R., and Sekaran, S. D. (2016). Transcriptome analysis of *Streptococcus pneumoniae* treated with the designed antimicrobial peptides, DM3. *Sci. Rep.* 6:26828

37 Page, K., Wilson, M., Parkin, I. P. Antimicrobial surfaces and their potential in reducing the role of the inanimate environment in the incidence of hospital-acquired infections. *Journal of Materials Chemistry*, 2009, 19(23), 3819

38 Chaloupka, K., Malam, Y., Seifalian, A. M. Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications. *Trends in Biotechnology*, 2010, 28(11), 580–588

Eckhardt, S., Brunetto, P. S., Gagnon, J., Priebe, M., Giese, B., Fromm, K. M. Nanobio Silver: Its Interactions with Peptides and Bacteria, and Its Uses in Medicine. *Chemical Reviews*, 2013, 113(7), 4708–4754

39 Eckhardt, S., Brunetto, P. S., Gagnon, J., Priebe, M., Giese, B., Fromm, K. M. Nanobio Silver: Its Interactions with Peptides and Bacteria, and Its Uses in Medicine. *Chemical Reviews*, 2013, 113(7), 4708–4754

40 Lemire, J. A., Harrison, J. J., Turner, R. J. Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. *Nature Reviews Microbiology*, 2013, 11(6), 371–384

- 41 Samani, S., Hossainipour, S. M., Tamizifar, M., Rezaie, H. R. In vitro antibacterial evaluation of sol-gel-derived Zn-, Ag-, and (Zn + Ag)-doped hydroxyapatite coatings against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2012, 101A(1), 222–230
- 42 Jin, G., Qin, H., Cao, H., Qian, S., Zhao, Y., Peng, X., Zhang, X.; Liu, X.; Chu, P. K. Synergistic effects of dual Zn/Ag ion implantation in osteogenic activity and antibacterial ability of titanium. *Biomaterials*, 2014, 35(27), 7699–7713
- 43 Storm, W. L., Johnson, J. A., Worley, B. V., Slomberg, D. L., & Schoenfisch, M. H. Dual action antimicrobial surfaces via combined nitric oxide and silver release. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2014, 103(6), 1974–1984
- 44 Carpenter, A. W., & Schoenfisch, M. H. Nitric oxide release: Part II. Therapeutic applications. *Chemical Society Reviews*, 2012, 41(10), 3742
- 45 Michl, T. D., Coad, B. R., Doran, M., Osiecki, M., Kafshgari, M. H., Voelcker, N. H., Hüsler, A., Vasilev, K., Griesser, H. J. Nitric oxide releasing plasma polymer coating with bacteriostatic properties and no cytotoxic side effects. *Chemical Communications*, 2015, 51(32), 7058–7060
- 46 Rtimi, S., Baghriche, O., Pulgarin, C., Lavanchy, J.-C., & Kiwi, J. Growth of TiO<sub>2</sub>/Cu films by HiPIMS for accelerated bacterial loss of viability. *Surface and Coatings Technology*, 2013, 232, 804–813
- 47 Hetrick, E. M., & Schoenfisch, M. H. Reducing implant-related infections: active release strategies. *Chemical Society Reviews*, 2006, 35(9), 780
- 48 Busscher, H. J., van der Mei, H. C., Subbiahdoss, G., Jutte, P. C., van den Dungen, J. J. A. M., Zaat, S. A. J., Grainger, D. W. Biomaterial-Associated Infection: Locating the Finish Line in the Race for the Surface. *Science Translational Medicine*, 2012, 4(153), 153rv10–153rv10
- 49 Kohnen, W. Development of a long-lasting ventricular catheter impregnated with a combination of antibiotics. *Biomaterials*, 2003, 24(26), 4865–4869
- 50 Fayaz, A. M., Balaji, K., Girilal, M., Yadav, R., Kalaichelvan, P. T., & Venketesan, R. Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against gram-positive and gram-negative bacteria. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2010, 6(1), 103–109

51 Varisco, M., Khanna, N., Brunetto, P. S., & Fromm, K. M. New Antimicrobial and Biocompatible Implant Coating with Synergic Silver-Vancomycin Conjugate Action. *ChemMedChem*, 2014, 9(6), 1221–1230

52 Morones-Ramirez, J. R., Winkler, J. A., Spina, C. S., & Collins, J. J. Silver Enhances Antibiotic Activity Against Gram-Negative Bacteria. *Science Translational Medicine*, 2013, 5(190), 190ra81–190ra81

53 Li, Z., Lee, D., Sheng, X., Cohen, R. E., & Rubner, M. F. Two-Level Antibacterial Coating with Both Release-Killing and Contact-Killing Capabilities. *Langmuir*, 2006, 22(24), 9820–9823

54 Lichter, J. A., Van Vliet, K. J., & Rubner, M. F. Design of Antibacterial Surfaces and Interfaces: Polyelectrolyte Multilayers as a Multifunctional Platform. *Macromolecules*, 2009, 42(22), 8573–8586

55 Worley, B. V., Slomberg, D. L., & Schoenfisch, M. H. Nitric Oxide-Releasing Quaternary Ammonium-Modified Poly(amidoamine) Dendrimers as Dual Action Antibacterial Agents. *Bioconjugate Chemistry*, 2014, 25(5), 918–927

56 Ho, C. H., Tobis, J., Sprich, C., Thomann, R., & Tiller, J. C. Nanoseparated Polymeric Networks with Multiple Antimicrobial Properties. *Advanced Materials*, 2004, 16(12), 957–961

57 Hu, R., Li, G., Jiang, Y., Zhang, Y., Zou, J.-J., Wang, L., & Zhang, X. Silver-Zwitterion Organic-Inorganic Nanocomposite with Antimicrobial and Antiadhesive Capabilities. *Langmuir*, 2013, 29(11), 3773–3779

58 Yu, Q., Wu, Z., & Chen, H. Dual-function antibacterial surfaces for biomedical applications. *Acta Biomaterialia*, 2015, 16, 1–13

59 Grainger, D. W., van der Mei, H. C., Jutte, P. C., van den Dungen, J. J. A. M., Schultz, M. J., van der Laan, B. F. A. M., Busscher, H. J. Critical factors in the translation of improved antimicrobial strategies for medical implants and devices. *Biomaterials*, 2013, 34(37), 9237–9243

60 Klein, E.Y.; Van Boeckel, T.P.; Martinez, E.M.; Pant, S.; Gandra, S.; Levin, S.A.; Goossens, H.; Laxminarayan R. Global Increase and Geographic Convergence in Antibiotic Consumption Between 2000 and 2015. *PNAS* **2018**, *115*(15), 3463-3470

61 Gelband, H.; Molly Miller, P.; Pant, S.; Gandra, S.; Levinson, J.; Barter, D.; White, A.; Laxminarayan, R. Wound Healing Southern Africa - the State of the World's Antibiotics 2015. *Wound Heal. South. Africa* **2015**, *8*(2), 30–34

62 Van Boeckel, T.P.; Gandra, S.; Ashok, A.; Caudron, Q.; Grenfell, B.T.; Levin, S.A.; Laxminarayan, R. Global Antibiotic Consumption 2000 to 2010: an Analysis of National Pharmaceutical Sales Data. *Lancet Infect. Dis.* **2014**, *14*(8), 742–750

63 Wei, Q.; Ji, J.; Fu, J.; Shen, J. Norvancomycin-Capped Silver Nanoparticles: Synthesis and Antibacterial Activities Against *E. coli*. *Sci. China B* **2007**, *50*, 418–424

64 Nazari, P.; Dowlatabadi-Bazaz, R.; Mofid, M.R.; Pourmand, M.R.; Daryani, N.E.; Faramarzi, M.A.; Sepehrizadeh, Z.; Shahverdi, A.R. The Antimicrobial Effects and Metabolomic Footprinting of Carboxyl-Capped Bismuth Nanoparticles against *Helicobacter Pylori*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2014**, *172*(2), 570–579

65 Zheng, K.; Setyawati, M.I.; Leong, D.T.; Xie, J. Antimicrobial Gold Nanoclusters. *ACS Nano* **2017**, *11*, 6904–6910

66 Bezza, F.A.; Tichapondwa, S.M.; Chirwa, E.M.N. Fabrication of Monodispersed Copper Oxide Nanoparticles with Potential Application as Antimicrobial Agents. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 1–18

67 Ren, T.; Yang, M.; Wang, K.; Zhang, Y.; He, J. CuO Nanoparticles-Containing Highly Transparent and Superhydrophobic Coatings with Extremely Low Bacterial Adhesion and Excellent Bactericidal Property. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10*(30), 25717-25725

68 Slomberg, D.L.; Lu, Y.; Broadnax, A.D.; Hunter, R.A.; Carpenter, A.W., Schoenfisch, M.H. Role of Size and Shape on Biofilm Eradication for Nitric Oxide-Releasing Silica Nanoparticles. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2013**, *5*(19), 9322–9329

69 Gabrielyan, L.; Badalyan, H.; Gevorgyan, V.; Trchounian, A. Comparable Antibacterial Effects and Action Mechanisms of Silver and Iron Oxide Nanoparticles on *Escherichia Coli* and *Salmonella Typhimurium*. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 13145–13157

70 Manyasree, D.; Kiranmayi, P. Synthesis, Characterization and Antibacterial Activity of Aluminium Oxide Nanoparticles. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **2018**, *10*, 3–6

71 Amini, S.M. Preparation of Antimicrobial Metallic Nanoparticles with Bioactive Compounds. *Mater. Sci. Eng. C* **2019**, *103*, 109809

72 Surmeneva, M.; Lapanje, A.; Chudinova, E.; Ivanova A.; Koptyug, A.; Loza, K.; Prymak, O.; Epple, M.; Ennen-Roth, F.; Ulbricht, M.; Rijavec, T.; Surmenev R. Decreased Bacterial Colonization of Additively Manufactured Ti6Al4V Metallic Scaffolds with Immobilized Silver and Calcium Phosphate Nanoparticles. *Applied Surface Science*, **2019**, *480(3)*, 822-829

73 Vu, X. H.; Duong, T. T. T.; Pham, T. T. H.; Trinh, D. K.; Nguyen, X. H.; Dang, V.-S. Synthesis and Study of Silver Nanoparticles for Antibacterial Activity against Escherichia Coli and Staphylococcus Aureus. *Adv. Nat. Sci.: Nanosci. Nanotechnol.* **2018**, *9(2)*, 025019

74 Li, Q.; Mahendra, S.; Lyon, D. Y.; Brunet, L.; Liga, M. V.; Li, D.; Alvarez, P. J. J. Antimicrobial Nanomaterials for Water Disinfection and Microbial Control: Potential Applications and Implications. *Water Res.* **2008**, *42(18)*, 4591–4602

75 Li, W.-R.; Xie, X.-B.; Shi, Q.-S.; Zeng, H.-Y.; OU-Yang, Y.-S.; Chen, Y.-B. Antibacterial Activity and Mechanism of Silver Nanoparticles on Escherichia Coli. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *85(4)*, 1115–1122

76 Davidović, S.; Lazić, V.; Miljković, M.; Gordić, M.; Sekulić, M.; Marinović-Cincović, M.; Ratnayakec, I.S.; Ahrenkielc, S.Ph.; Nedeljković, J. M. Antibacterial Ability of Immobilized Silver Nanoparticles in Agar-Agar Films Co-Doped with Magnesium Ions. *Carbohydr. Polym.* **2019**, *224*, 115187

77 Baranwal, A., Srivastava, A., Kumar, P., Bajpai, V. K., Maurya, P. K., Chandra, P. (2018). Prospects of nanostructure materials and their composites as antimicrobial agents. *Front. Microbiol.* *9*, 422

78 Dizaj, S. M., Lotfipour, F., Barzegar-Jalali, M., Zarrintan, M. H., Adibkia, K. (2014). Antimicrobial activity of the metals and metal oxide nanoparticles. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* *44*, 278–284

79 Soares, E.N.; Soares, H.M.V.M. Harmful Effects of Metal(loid) Oxide Nanoparticles. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2021**, *105*, 1379-1394

80 Girigoswami, K. Toxicity of Metal Oxide Nanoparticles. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2018**, *1048*, 99-122

81 Tang, J.; Xiong, L.; Wang, S.; Wang, J.; Liu, L.; Li, J.; Yuan, F.; Xi, T. Distribution, Translocation and Accumulation of Silver Nanoparticles in Rats. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2009**, *9(8)*, 4924–4932

- 82 Trouiller, B.; Reliene, R.; Westbrook, A.; Solaimani, P.; Schiestl, R. H. Titanium Dioxide Nanoparticles Induce DNA Damage and Genetic Instability In vivo in Mice. *Cancer Res.* **2009**, *69*(22), 8784–8789
- 83 Jan, A.; Azam, M.; Siddiqui, K.; Ali, A.; Choi, I.; Haq, Q. Heavy Metals and Human Health: Mechanistic Insight into Toxicity and Counter Defense System of Antioxidants. *Int. J. Molec. Sci.* **2015**, *16*(12), 29592–29630
- 84 Chen, C. W., Hsu, C. Y., Lai, S. M., Syu, W. J., Wang, T. Y., Lai, P. S. (2014). Metal nanobullets for multidrug resistant bacteria and biofilms. *Adv. Drug Deliv. Rev.* *78*, 88–104
- 85 Dizaj, S. M., Lotfipour, F., Barzegar-Jalali, M., Zarrintan, M. H., Adibkia, K. (2014). Antimicrobial activity of the metals and metal oxide nanoparticles. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* *44*, 278–284
- 86 Rudramurthy, G. R., Swamy, M. K., Sinniah, U. R., Ghasemzadeh, A. (2016). Nanoparticles: alternatives against drug-resistant pathogenic microbes. *Molecules* *21*
- 87 Hemeg, H. A. (2017). Nanomaterials for alternative antibacterial therapy. *Int. J. Nanomed.* *12*, 8211–8225
- 88 Zaidi, S., Misba, L., Khan, A. U. (2017). Nano-therapeutics: a revolution in infection control in post antibiotic era. *Nanomedicine* *13*, 2281–2301
- 89 Cavassin, E. D., De Figueiredo, L. F., Otoch, J. P., Seckler, M. M., De Oliveira, R. A., Franco, F. F., et al. (2015). Comparison of methods to detect the *in vitro* activity of silver nanoparticles (AgNP) against multidrug resistant bacteria. *J. Nanobiotechnology* *13*, 64
- 90 Chatterjee, A. K., Chakraborty, R., Basu, T. (2014). Mechanism of antibacterial activity of copper nanoparticles. *Nanotechnology* *25*, 135101
- 91 Vandebriel, R. J., De Jong, W. H. (2012). A review of mammalian toxicity of ZnO nanoparticles. *Nanotechnol. Sci. Appl.* *5*, 61–71
- 92 Porta, E.; Cogliati, S.; Francisco, M.; Roldán, M. V.; Mamana, N.; Grau, R.; Pellegrini, N. Stable Colloidal Copper Nanoparticles Functionalized with Siloxane Groups and Their Microbicidal Activity. *J. Inorg. Organomet. Polym.* **2019**, *29*, 964–978
- 93 Yoon, K.-Y.; Hoon Byeon, J.; Park, J.-H.; Hwang, J. Susceptibility Constants of Escherichia Coli and Bacillus Subtilis to Silver and Copper Nanoparticles. *Sci. Total. Environ.* **2007**, *373*(2-3), 572–575

- 94 Azam, A.; Arham S.A.; Oves, M.; Khan, M. S.; Memic, A. Size-Dependent Antimicrobial Properties of CuO Nanoparticles against Gram-Positive and Gram-Negative Bacterial Strains. *Int. J. Nanomed.* **2012**, *7*, 3527-3535
- 95 Lu, Z., Rong, K., Li, J., Yang, H., Chen, R. (2013). Size-dependent antibacterial activities of silver nanoparticles against oral anaerobic pathogenic bacteria. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* *24*, 1465–1471
- 96 Lesniak, A., Salvati, A., Santos-Martinez, M. J., Radomski, M. W., Dawson, K. A., Aberg, C. (2013). Nanoparticle adhesion to the cell membrane and its effect on nanoparticle uptake efficiency. *J. Am. Chem. Soc.* *135*, 1438–1444
- 97 Khan, S. T., Musarrat, J., Al-Khedhairi, A. A. (2016). Countering drug resistance, infectious diseases, and sepsis using metal and metal oxides nanoparticles: current status. *Colloids Surf. B Biointerfaces* *146*, 70–83
- 98 Stewart, P. S. (2002). Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *Int. J. Med. Microbiol.* *292*, 107–113
- 99 Khan, S. T., Musarrat, J., Al-Khedhairi, A. A. (2016). Countering drug resistance, infectious diseases, and sepsis using metal and metal oxides nanoparticles: current status. *Colloids Surf. B Biointerfaces* *146*, 70–83
- 100 Zaidi, S., Misba, L., Khan, A. U. (2017). Nano-therapeutics: a revolution in infection control in post antibiotic era. *Nanomedicine* *13*, 2281–2301
- 101 Kollef, M.H.; Golan, Y.; Micek, S.T.; Shorr, A.F.; Restrepo M.I. Appraising contemporary strategies to combat multidrug resistant gram-negative bacterial infections- proceedings and data from the gram-negative resistance summit. *Clin. Infect. Dis.*, *53* (2011), 33-55
- 102 R. Thomas, A.P. Nair, K.R. Soumya, J. Mathew, E.K. Radhakrishnan Antibacterial activity and synergistic effect of biosynthesized agnps with antibiotics against multidrug-resistant biofilm-forming coagulase-negative staphylococci isolated from clinical samples. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, *173* (2) (2014), 449-460
- 103 A.M. Fayaz, K. Balaji, M. Girilal, R. Yadav, P.T. Kalaichelvan, R. Venketesan Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against gram-positive and gram-negative bacteria. *Nanomed.-Nanotechnol. Biol. Med.*, *6* (1) (2010), 103-109

- 104 Naqvi, S.Z.H.; Kiran, U.; Ali, M. I.; Jamal, A.; Hameed, A.; Ahmed, S.; Ali N. Combined efficacy of biologically synthesized silver nanoparticles and different antibiotics against multidrug-resistant bacteria. *Int. J. Nanomedicine*, 8 (2013), 1-9
- 105 G. Thirumurugan, J. Rao, M.D. Dhanaraju Elucidating pharmacodynamic interaction of silver nanoparticle - topical deliverable antibiotics. *Sci. Rep.*, 6 (2016), 1-11
- 106 M. Smekalova, V. Aragon, A. Panacek, R. Prucek, R. Zboril, L. Kvitek Enhanced antibacterial effect of antibiotics in combination with silver nanoparticles against animal pathogens. *Vet. J.*, 209 (2016), 174-179
- 107 M. Harshiny, M. Matheswaran, G. Arthanareeswaran, S. Kumaran, S. Rajasree Enhancement of antibacterial properties of silver nanoparticles-ceftriaxone conjugate through *Mukia maderaspatana* leaf extract mediated synthesis. *Ecotox. Environ. Safe.*, 121 (2015), 135-141
- 108 S.S. Birla, V.V. Tiwari, A.K. Gade, A.P. Ingle, A.P. Yadav, M.K. Rai Fabrication of silver nanoparticles by *Phoma glomerata* and its combined effect against *Escherichia coli* *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 48 (2) (2009), 173-179
- 109 I.S. Hwang, J.H. Hwang, H. Choi, K.J. Kim, D.G. Lee Synergistic effects between silver nanoparticles and antibiotics and the mechanisms involved. *J. Med. Microbiol.*, 61 (12) (2012), 1719-1726
- 110 N. Hari, T.K. Thomas, A.J. Nair Comparative study on the synergistic action of garlic synthesized and citrate capped silver nanoparticles with antibiotics. *ISRN Nanotechnol.*, 2013 (2013), 1-6
- 111 S. Kalita, R. Kandimalla, K.K. Sharma, A.C. Katak, M. Deka, J. Kotoky Amoxicillin functionalized gold nanoparticles reverts MRSA resistance *Mater. Sci. Eng. C-Mater. Biol. Appl.*, 61 (2016), 720-727
- 112 C.M.J. Silvero, D.M. Rocca, E.A. de la Villarmois, K. Fournier, A.E. Lanterna, M.F. Perez, M.C. Becerra, J.C. Scaiano Selective photoinduced antibacterial activity of amoxicillin-coated gold nanoparticles: from one-step synthesis to in vivo cytocompatibility. *ACS Omega*, 3 (1) (2018), 1220-1230

- 113 T. Roshmi, K.R. Soumya, M. Jyothis, E.K. Radhakrishnan Effect of biofabricated gold nanoparticle-based antibiotic conjugates on minimum inhibitory concentration of bacterial isolates of clinical origin. *Gold Bull.*, 48 (1-2) (2015), 63-71
- 114 L. Rastogi, A.J. Kora, J. Arunachalam Highly stable, protein capped gold nanoparticles as effective drug delivery vehicles for amino-glycosidic antibiotics. *Mater. Sci. Eng. C-Mater. Biol. Appl.*, 32 (6) (2012), 1571-1577
- 115 S. Perni, C. Piccirillo, J. Pratten, P. Prokopovich, W. Chrzanowski, I.P. Parkin, M. Wilson The antimicrobial properties of light-activated polymers containing methylene blue and gold nanoparticles. *Biomaterials*, 30 (1) (2009), 89-93
- 116 G.L. Burygin, B.N. Khlebtsov, A.N. Shantrokha, L.A. Dykman, V.A. Bogatyrev, N.G. Khlebtsov On the enhanced antibacterial activity of antibiotics mixed with gold nanoparticles. *Nanoscale Res. Lett.*, 4 (8) (2009), 794-801
- 117 H. Motamedi, S.K. Mazdeh, A.A. Khiavi, M.R. Mehrabi Optimization of gold nanoparticle biosynthesis by *Escherichia coli* DH5 alpha and its conjugation with gentamicin. *J. Nanopart. Res.*, 32 (2015), 1-6
- 118 H.W. Gu, P.L. Ho, E. Tong, L. Wang, B. Xu Presenting vancomycin on nanoparticles to enhance antimicrobial activities. *Nano Lett.*, 3 (9) (2003), 1261-1263
- 119 A.M. Fayaz, M. Girilal, S.A. Mandy, S.S. Somsundar, R. Venkatesan, P.T. Kalaichelvan Vancomycin bound biogenic gold nanoparticles: a different perspective for development of anti VRSA agents. *Process Biochem.*, 46 (3) (2011), 636-641
- 120 S. Baker, A. Pasha, S. Satish Biogenic nanoparticles bearing antibacterial activity and their synergistic effect with broad spectrum antibiotics: emerging strategy to combat drug resistant pathogens *Saudi Pharm. J.*, 25 (1) (2017), 44-51
- 121 M.M. dos Santos, M.J. Queiroz, P.V. Baptista Enhancement of antibiotic effect via gold: silver-alloy nanoparticles. *J. Nanopart. Res.*, 14 (5) (2012), 1-8
- 122 A.N. Brown, K. Smith, T.A. Samuels, J.R. Lu, S.O. Obare, M.E. Scott Nanoparticles functionalized with ampicillin destroy multiple-antibiotic-resistant isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter aerogenes* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 78 (8) (2012), 2768-2774

- 123 C. Khurana, P. Sharma, O.P. Pandey, B. Chudasama Synergistic effect of metal nanoparticles on the antimicrobial activities of antibiotics against biorecycling microbes. *J. Mater. Sci. Technol.*, 32 (6) (2016), 524-532
- 124 K. Cihalova, D. Chudobova, P. Michalek, A. Moulick, R. Guran, P. Kopel, V. Adam, R. Kizek Staphylococcus aureus and MRSA growth and biofilm formation after treatment with antibiotics and SeNPs. *Int. J. Mol. Sci.*, 16 (10) (2015), 24656-24672
- 125 X.Q. Huang, X. Chen, Q.C. Chen, Q.Q. Yu, D.D. Sun, J. Liu Investigation of functional selenium nanoparticles as potent antimicrobial agents against superbugs. *Acta Biomater.*, 30 (2016), 397-407
- 126 P. Patra, S. Mitra, N. Debnath, P. Pramanik, A. Goswami Ciprofloxacin conjugated zinc oxide nanoparticle: A camouflage towards multidrug resistant bacteria. *Bull. Mater. Sci.*, 37 (2) (2014), 199-206
- 127 S. Iram, A. Nadhman, N. Akhtar, A. Hameed, Z. Zulfiqar, M.A. Yameen Potentiating efficacy of antibiotic conjugates with zinc oxide nanoparticles against clinical isolates of Staphylococcus aureus. *Dig. J. Nanomater. Biostruct.*, 10 (3) (2015), 901-914
- 128 M. Banoe, S. Seif, Z.E. Nazari, P. Jafari-Fesharaki, H.R. Shahverdi, A. Moballegh, K.M. Moghaddam, A.R. Shahverdi ZnO nanoparticles enhanced antibacterial activity of ciprofloxacin against Staphylococcus aureus and Escherichia coli. *J. Biomed. Mater. Res. Part B*, 93B (2) (2010), 557-561
- 129 Q. Zhong, J.H. Tian, T.L. Liu, Z.Z. Guo, S. Ding, H. Li Preparation and antibacterial properties of carboxymethyl chitosan/ZnO nanocomposite microspheres with enhanced biocompatibility. *Mater. Lett.*, 212 (2018), 58-61
- 130 L.R. Arias, L.J. Yang Inactivation of Bacterial Pathogens by Carbon Nanotubes in Suspensions. *Langmuir*, 25 (5) (2009), 3003-3012
- 131 S. Aslan, C.Z. Loebick, S. Kang, M. Elimelech, L.D. Pfefferle, P.R. Van Tassel Antimicrobial biomaterials based on carbon nanotubes dispersed in poly (lactic-co-glycolic acid). *Nanoscale*, 2 (9) (2010), pp. 1789-1794
- 132 S. Kang, M. Herzberg, D.F. Rodrigues, M. Elimelech Antibacterial effects of carbon nanotubes: Size does matter. *Langmuir*, 24 (13) (2008), pp. 6409-641

- 133 W. Wu, S. Wieckowski, G. Pastorin, M. Benincasa, C. Klumpp, J.P. Briand, R. Gennaro, M. Prato, A. Bianco Targeted delivery of amphotericin B to cells by using functionalized carbon nanotubes *Angew. Chem.-Int. Edit.*, 44 (39) (2005), pp. 6358-6362
- 134 I. Banerjee, D. Mondal, J. Martin, R.S. Kane Photoactivated antimicrobial activity of carbon nanotube-porphyrin conjugates. *Langmuir*, 26 (22) (2010), 17369-17374
- 135 X.B. Qi, G. Poernomo, K.A. Wang, Y.A. Chen, M.B. Chan-Park, R. Xu, M.W. Chang Covalent immobilization of nisin on multi-walled carbon nanotubes: superior antimicrobial and anti-biofilm properties. *Nanoscale*, 3 (4) (2011), 1874-1880
- 136 M.J. Hajipour, K.M. Fromm, A.A. Ashkarran, D.J. de Aberasturi, I.R. de Larramendi, T. Rojo, V. Serpooshan, W.J. Parak, M. Mahmoudi Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends Biotechnol.*, 30 (10) (2012), 499-511
- 137 T.S. Crofts, A.J. Gasparrini, G. Dantas Next-generation approaches to understand and combat the antibiotic resistome. *Nat. Rev. Microbiol.*, 15 (7) (2017), 422-434
- 138 H. Bozetine, Q. Wang, A. Barras, M.S. Li, T. Hadjersi, S. Szunerits, R. Boukherroub Green chemistry approach for the synthesis of ZnO-carbon dots nanocomposites with good photocatalytic properties under visible light. *J. Colloid Interface Sci.*, 465 (2016), 286-294
- 139 A. Kumar, G. Patel, S.K. Menon Fullerene isoniazid conjugate - a tuberculostat with increased lipophilicity: synthesis and evaluation of antimycobacterial activity. *Chem. Biol. Drug Des.*, 73 (5) (2009), 553-557
- 140 M.B. Patel, S.P. Kumar, N.N. Valand, Y.T. Jasrai, S.K. Menon Synthesis and biological evaluation of cationic fullerene quinazolinone conjugates and their binding mode with modeled mycobacterium tuberculosis hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase enzyme. *J. Mol. Model.*, 19 (8) (2013), 3201-3217
- 141 M.B. Patel, U. Harikrishnan, N.N. Valand, N.R. Modi, S.K. Menon Novel cationic quinazolin-4(3H)-one conjugated fullerene nanoparticles as antimycobacterial and antimicrobial agents. *Arch. Pharm.*, 346 (3) (2013), 210-220
- 142 L.F. Qi, Z.R. Xu, X. Jiang, C.H. Hu, X.F. Zou Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. *Carbohydr. Res.*, 339 (16) (2004), 2693-2700

- 143 S.P. Chakraborty, S.K. Sahu, P. Pramanik, S. Roy In vitro antimicrobial activity of nanoconjugated vancomycin against drug resistant *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Pharm.*, 436 (1-2) (2012), 659-676
- 144 N.K. Gayathri, V. Aparna, S. Maya, R. Biswas, R. Jayakumar, C.G. Mohan Preparation, characterization, drug release and computational modelling studies of antibiotics loaded amorphous chitin nanoparticles. *Carbohydr. Polym.*, 177 (2017), 67-76
- 145 H.Y. Chen, M. Zhang, B.W. Li, D. Chen, X.Y. Dong, Y.H. Wang, Y.Q. Gu Versatile antimicrobial peptide-based ZnO quantum dots for in vivo bacteria diagnosis and treatment with high specificity. *Biomaterials*, 53 (2015), 532-544
- 146 S. Park, H. Chibli, J. Wong, J.L. Nadeau Antimicrobial activity and cellular toxicity of nanoparticle-polymyxin B conjugates. *Nanotechnology*, 22 (18) (2011), 1-10
- 147 Z.H. Luo, Q.S. Wu, M. Zhang, P. Li, Y.P. Ding Cooperative antimicrobial activity of CdTe quantum dots with rocephin and fluorescence monitoring for *Escherichia coli*. *J. Colloid Interface Sci.*, 362 (1) (2011), 100-106
- 148 S.R. Aashis, P. Ameena, A.R. Koppalkar, M.V.N.A. Prasad Effect of nano - titanium dioxide with different antibiotics against methicillin-resistant *staphylococcus aureus*. *J. Biomaterials Nanobiotech.*, 1 (1) (2010), 1-5
- 149 P. Bhattacharya, S. Neogi Gentamicin coated iron oxide nanoparticles as novel antibacterial agents. *Mater. Res. Express*, 4 (9) (2017), 1-12
- 150 N. Duran, P.D. Marcato, R. De Conti, O.L. Alves, F.T.M. Costa, M. Brocchi Potential use of silver nanoparticles on pathogenic bacteria, their toxicity and possible mechanisms of action. *J. Braz. Chem. Soc.*, 21 (6) (2010), 949-9591
- 151 P. Li, J. Li, C.Z. Wu, Q.S. Wu, J. Li Synergistic antibacterial effects of beta-lactam antibiotic combined with silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 16 (9) (2005), 1912-1917
- 152 A.T.M. Saeb, A.S. Alshammari, H. Al-Brahim, K.A. Al-Rubeaan Production of silver nanoparticles with strong and stable antimicrobial activity against highly pathogenic and multidrug resistant bacteria. *Sci. World J.*, 2014 (2014), 1-9
- 153 Y.C. Yeh, B. Creran, V.M. Rotello Gold nanoparticles: preparation, properties, and applications in bionanotechnology. *Nanoscale*, 4 (6) (2012), 1871-1880

- 154 M.A. Shaker, M.I. Shaaban Formulation of carbapenems loaded gold nanoparticles to combat multi-antibiotic bacterial resistance: In vitro antibacterial study. *Int. J. Pharm.*, 525 (1) (2017), 71-84
- 155 Y. Cui, Y.Y. Zhao, Y. Tian, W. Zhang, X.Y. Lu, X.Y. Jiang The molecular mechanism of action of bactericidal gold nanoparticles on *Escherichia coli* *Biomaterials*, 33 (7) (2012), 2327-2333
- 156 S.A. Wadhvani, U.U. Shedbalkar, R. Singh, B.A. Chopade Biogenic selenium nanoparticles: current status and future prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 100 (6) (2016), 2555-2566
- 157 T. Kruk, K. Szczepanowicz, J. Stefanska, R.P. Socha, P. Warszynski Synthesis and antimicrobial activity of monodisperse copper nanoparticles. *Colloid Surf. B-Biointerfaces*, 128 (2015), 17-22
- 158 U. Bogdanovic, V. Lazic, V. Vodnik, M. Budimir, Z. Markovic, S. Dimitrijevic Copper nanoparticles with high antimicrobial activity. *Mater. Lett.*, 128 (2014), 75-78
- 159 J. Ramyadevi, K. Jeyasubramanian, A. Marikani, G. Rajakumar, A.A. Rahuman Synthesis and antimicrobial activity of copper nanoparticles. *Mater. Lett.*, 71 (2012), 114-116
- 160 Sandhiya, S., Dkhar, S. A., Surendiran, A. (2009). Emerging trends of nanomedicine—an overview. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 23, 263–269
- 161 Huh, A. J., Kwon, Y. J. (2011). “Nanoantibiotics”: a new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. *J. Control. Release* 156, 128–145
- 162 Baptista, P. V., Mccusker, M. P., Carvalho, A., Ferreira, D. A., Mohan, N. M., Martins, M., et al. (2018). Nano-strategies to fight multidrug resistant bacteria—“a battle of the titans”. *Front. Microbiol.* 9, 1441
- 163 Zazo, H., Colino, C. I., Lanao, J. M. (2016). Current applications of nanoparticles in infectious diseases. *J. Control. Release* 224, 86–102
- 164 Zaidi, S., Misba, L., Khan, A. U. (2017). Nano-therapeutics: a revolution in infection control in post antibiotic era. *Nanomedicine* 13, 2281–2301
- 165 Y. Yang , A. M. Asiri , Z. Tang , D. Du and Y. Lin , *Mater. Today*, 2013, 16 , 365 — 373

- 166 S. Pandit , Z. J. Cao , V. R. S. S. Mokka pati , E. Celauro , A. Yurgens , M. Lovmar , F. Westerlund , J. Sun and I. Mijakovic , *Adv. Mater. Interfaces*, 2018, 5 , 1701331
- 167 Randviir, E. P., Brownson, D. A. C., and Banks, C. E. (2014). A decade of graphene research: production, applications and outlook. *Mater. Today* 17, 426–432
- 168 Kang, S., Lee, D., Kim, J., Capasso, A., Kang, H. S., Park, J.-W., et al. (2020). 2D semiconducting materials for electronic and optoelectronic applications: potential and challenge. *2D Mater.* 7:022003
- 169 Novoselov, K. S., Geim, A. K., Morozov, S. V., Jiang, D., Zhang, Y., Dubonos, S. V., et al. (2004). Electric field in atomically thin carbon films. *Science* 306, 666–669
- 170 Allen, M. J., Tung, V. C., and Kaner, R. B. (2010). Honeycomb carbon: a review of graphene. *Chem. Rev.* 110, 132–145
- 171 S. Pandit , Z. J. Cao , V. R. S. S. Mokka pati , E. Celauro , A. Yurgens , M. Lovmar , F. Westerlund , J. Sun and I. Mijakovic , *Adv. Mater. Interfaces*, 2018, 5 , 1701331
- 172 Y. Liu , J. Wen , Y. Gao , T. Li , H. Wang , H. Yan , B. Niu and R. Guo , *Appl. Surf. Sci.*, 2018, 436 , 624 —630
- 173 Y. Liu , X. Dong and P. Chen , *Chem. Soc. Rev.*, 2012, 41 , 2283 —2307
- 174 K. Yang , S. Zhang , G. Zhang , X. Sun , S. T. Lee and Z. Liu , *Nano Lett.*, 2010, 10 , 3318 —3323
- 175 Z. Liu , J. T. Robinson , X. Sun and H. Dai , *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, 130 , 10876 —10877
- 176 X. Zou , L. Zhang , Z. Wang and Y. Luo , *J. Am. Chem. Soc.*, 2016, 138 , 2064 —2077
- 177 Lynch, R. W., and Drickamer, H. G. (1966). Effect of high pressure on the lattice parameters of diamond, graphite, and hexagonal boron nitride. *J. Chem. Phys.* 44, 181–184
- 178 Mahvash, F., Eissa, S., Bordjiba, T., Tavares, A. C., Szkopek, T., and Siaj, M. (2017). Corrosion resistance of monolayer hexagonal boron nitride on copper. *Sci. Rep.* 7:42139

179 Chilkoor, G., Karanam, S. P., Star, S., Shrestha, N., Sani, R. K., Upadhyayula, V. K. K., et al. (2018). Hexagonal boron nitride: the thinnest insulating barrier to microbial corrosion. *ACS Nano* 12, 2242–2252

180 Merlo, A., Mokkalapati, V. R. S. S., Pandit, S., and Mijakovic, I. (2018). Boron nitride nanomaterials: biocompatibility and bio-applications. *Biomater. Sci.* 6, 2298–2311

181 Mukheem, A., Shahabuddin, S., Akbar, N., Miskon, A., Muhamad Sarih, N., Sudesh, K., et al. (2019). Boron nitride doped polyhydroxyalkanoate/chitosan nanocomposite for antibacterial and biological applications. *Nanomaterials* 9:645

182 D. Golberg , Y. Bando , Y. Huang , T. Terao , M. Mitome , C. Tang and C. Zhi , *ACS Nano*, 2010, 4 , 2979 —2993

183 Nastulyavichusa, A.; Kudryashova, S.; Smirnova, N.; Saraeva, I.; Rudenko, A.; Tolordava, E.; Ionin, A.; Romanova, Y.; Zayarny, D. Antibacterial Coatings of Se and Si Nanoparticles, *Appl. Surf. Sci.* 2019, 469, 220-225

184 Feng, W.; Geng, Z.; Li, Z.; Cui, Z.; Zhu, S.; Liang, Y.; Liu, Y.; Wang, R.; Yang, X. Controlled Release Behavior and Antibacterial Affects of Antibiotic-Loaded Titania Nanotubes, *Mater. Sci. Eng. C* 2016, 62, 105-112

185 Fujie, T.; Saito, A.; Kinoshita, M.; Miyazaki, H.; Ohtsubo, S.; Saitoh, D.; Takeoka, S.; Dual Therapeutic Action of Antibiotic-Loaded Nanosheets for the Treatment of Gastrointestinal Tissue Defects, *Biomaterials* 2010, 31, 6269-6278

186 Zhang, W.; Mou, Z.; Wang, Y.; Chen, Y.; Yang, E.; Guo, F.; Sun, D.; Wang, W. Molybdenum Disulfide Nanosheets Loaded with Chitosan and Silver Nanoparticles Effective Antifungal Activities: in Vitro and in Vivo, *Mater. Sci. Eng. C* 2019, 97, 486-497

187 Shim, G.; Kim, M.-G.; Park, J.Y.; Oh, Y.-K. Graphene-Based Nanosheets for Delivery of Chemotherapeutics Andbiological Drugs, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2016, 105, 205-227

188 Shtansky, D.V.; Firestein, K.L.; Golberg, D. (Review) Fabrication and Application of BN Nanoparticles, Nanosheets, and Their Nanohybrids, *Nanoscale* 2018, 10, 17477-17493

189 Merlo, A.; Mokkalapati, V.R.S.S.; Pandit, S.; Mijakovic, I. Boron Nitride Nanomaterials: Biocompatibility and Bio-Applications. *Biomater. Sci.*, 2018, 6, 2298-2311

190 Horváth, L.; Magrez, A.; Golberg, D.; Zhi, C.; Bando, Y.; Smajda, R.; Horváth, E.; Forró, L.; Schwaller, B. In Vitro Investigation of the Cellular Toxicity of Boron Nitride Nanotubes. *ACS Nano* 2011, 5, 3800–3810

191 Mateti, S.; Wong, C.S.; Liu, Z.; Yang, W.; Li, Y.; Li, L.H.; Chen, Y. Biocompatibility of Boron Nitride Nanosheets. *Nano Res.* 2017, 11, 334–342

192 Ciofani, G.; Del Turco, S.; Rocca, A.; de Vito, G.; Cappello, V.; Yamaguchi, M.; Li, X.; Mazzolai, B.; Basta, G.; Gemmi, M.; Piazza, V.; Golberg, D.; Mattoli, V. Cytocompatibility Evaluation of Gum Arabic-Coated Ultra-Pure Boron Nitride Nanotubes on Human Cells. *Nanomed.* 2014, 9, 773–788

193 Sukhorukova, I.V.; Zhitnyak, I.Y.; Kovalskii, A.M.; Matveev, A.T.; Lebedev, O.I.; Gloushankova, N.A.; Li, X.; Golberg, D.; Shtansky, D.V. BN Nanoparticles with Petal-Like Surface as Anticancer Drug Delivery System. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2015, 7, 17217–17225

194 Zhitnyak, I.Y.; Bychkov, I.N.; Sukhorukova, I.V.; Kovalskii, A.M.; Firestein, K.L.; Golberg, D.; Gloushankova, N.A.; Shtansky, D.V. Effect of BN Nanoparticles Loaded with Doxorubicin on Tumor Cells with Multiple Drug Resistance. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2017, 9, 32498–32508

195 Türkez, H.; Arslan, M.E.; Sönmez, E.; Açikyıldız, M.; Tatar, A.; Geyikoğlu, F. Synthesis, Characterization and Cytotoxicity of Boron Nitride Nanoparticles: Emphasis on Toxicogenomics. *Cytotechnol.* 2019, 71, 351–361

196 Sharma, G.; Al Othman, Z. A.; Kumar, A.; Sharma, S.; Ponnusamy, S. K.; Naushad, M. Fabrication and Characterization of a Nanocomposite Hydrogel for Combined Photocatalytic Degradation of a Mixture of Malachite Green and Fast Green Dye. *Nanotechnol. Environ. Eng.* 2017, 2, 4

197 Jelinkova, P.; Mazumdar, A.; Sur, V. P.; Kociova, S.; Dolezelikova, K.; Jimenez, A. M. J.; Koudelkova, Z.; Mishra, P.K.; Smerkova, K.; Heger, Zb; Vaculovicova, M.; Moulick, A.; Adam, V. Nanoparticle-Drug Conjugates Treating Bacterial Infections. *J. Control. Release* 2019, 307, 166–185

198 Khurana, C.; Sharma, P.; Pandey, O. P.; Chudasama, B. Synergistic Effect of Metal Nanoparticles on the Antimicrobial Activities of Antibiotics against Biorecycling Microbes. *J. Mater. Sci. Technol.* 2016, 32(6), 524–532

- 199 Zheng, K.; Setyawati, M. I.; Lim, T.-P.; Leong, D. T.; Xie, J. Antimicrobial Cluster Bombs: Silver Nanoclusters Packed with Daptomycin. *ACS Nano* 2016, 10(8), 7934–7942
- 200 Kollef, M.H.; Golan, Y.; Micek, S.T.; Shorr, A.F.; Restrepo, M.I. Appraising Contemporary Strategies to Combat Multidrug Resistant Gram-Negative Bacterial Infections- Proceedings and Data from the Gram-Negative Resistance Summit. *Clinic. Infect. Dis.* 2011, 53, 33–55
- 201 Fitzgerald, K.T.; Newquist, K.L. Chapter 20 – Poisonings in the Captive Reptile, *Small Animal Toxicology (Third Edition)*, 2013, 229-249
- 202 Jakobsen, L.; Sandvang, D.; Jensen, V.F.; Seyfarth, F.M.; Frimodt-Møller, N.; Hammerum A.M. Gentamicin Susceptibility in *Escherichia coli* Related to the Genetic Background: Problems with Breakpoints, *Clinical Microbiol. Infect.* 2007, 13, 830-832
- 203 Sanjana Ghosh, Ruiquan Qi, Kevin A. Carter, Guojian Zhang, Blaine A. Pfeifer, Jonathan F. Lovella Loading and releasing ciprofloxacin in photoactivatable liposomes. *Biochemical Engineering Journal* Volume 141, 15 January 2019, 43-48
- 204 Rex, J.H.; Stevens, D.A. Drugs Active Against Fungi, Pneumocystis, and Microsporidia, In: Mandell, Douglas, Bennett's, Editors. *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 8th ed. Elsevier Saunders; Philadelphia, PA (2015) 492
- 205 Sukhorukova, I.V.; Sheveyko, A.N.; Manakhov, A.; Zhitnyak, I.Y.; Gloushankova, N.A.; Denisenko, E.A.; Filippovich, S.Yu.; Ignatov, S.G.; Shtansky, D.V. Synergistic and Long-Lasting Antibacterial Effect of Antibiotic-Loaded TiCaPCON-Ag Films Against Pathogenic Bacteria and Fungi, *Mater. Sci. Eng. C* 2018, 90, 289-299
- 206 Tomas, J.; Weston, N.E.; O'Connor, T.E. Boron Nitride, Thermal Transformation to Ordered-Layer-Lattice BN, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 84, 4619-4622
- 207 Shtansky, D.V.; Tsuda, O.; Ikuhara, Y.; Yoshida T. Crystallography and Structural Evolution of Cubic Boron Nitride Films During Bias Sputter Deposition, *Acta Materialia* **2000**, 48, 3745-3759
- 208 Moon, O.M.; Kang, B.C.; Lee, S.B.; Boo, J.H. Temperature Effect on Structural Properties of Boron Oxide Thin Films Deposited by MOCVD Method, *Thin Solid Films* **2004**, 464-465, 164-169

- 209 Machala, L.; Tuček, J.; Zbořil, R. Polymorphous transformations of nanometric iron(III) oxide: A review, *Chem. Mater.* **2011**, *23*, 3255-3272
- 210 Kamat, P.V. Meeting the Clean Energy Demand: Nanostructure Architectures for Solar Energy Conversion. *J. Phys. Chem. C*, **2007**, *111*, 2834–2860
- 211 Jia, C.-J.; Sun, L.-D.; Luo, F.; Han, X.-D.; Heyderman, L. J.; Yan, Z.-G.; Yan, Ch.-H.; Zheng, K.; Zhang, Z.; Takano, M.; Hayashi, N.; Eltschka, M.; Kläui, M.; Rüdiger, U.; Kasama, T.; Cervera-Gontard, L.O.; Dunin-Borkowski, E.R.; Tzvetkov, O.G.; Raabe, J. Large-scale synthesis of single-crystalline iron oxide magnetic nanorings. *J. Amer. Chem. Soc.* **2008**, *130(50)*, 16968–16977
- 212 Biesinger, M. C.; Payne, B. P.; Grosvenor, A. P.; Lau, L. W. M.; Gerson, A. R.; Smart, R. S. C. Resolving surface chemical states in XPS analysis of first row transition metals, oxides and hydroxides: Cr, Mn, Fe, Co and Ni. *Appl. Surf. Sci.* **2011**, *257*, 2717-2730
- 213 Yamashita, T.; Hayes, P. Analysis of XPS spectra of Fe<sup>2+</sup> and Fe<sup>3+</sup> ions in oxide materials. *Appl. Surf. Sci.* **2008**, *254*, 2441-2449
- 214 Grosvenor, A. P.; Kobe, B. A.; Biesinger, M. C.; McIntyre, N. S. Investigation of multiplet splitting of Fe 2p XPS spectra and bonding in iron compounds. *Surf. Interface Anal.* **2004**, *36*, 1564–1574
- 215 Yang, S.; Song, X.; Zhang, P.; Sun, J.; Gao, L. Self-assembled  $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> mesocrystals/graphene nanohybrid for enhanced electrochemical capacitors. *Small* **2014**, *10(11)*, 2270–2279
- 216 Tucek, J.; Zboril, R.; Namai, A.; Ohkoshi, S.  $\epsilon$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: An advanced nanomaterial exhibiting giant coercive field, millimeter-wave ferromagnetic resonance, and magnetoelectric coupling. *Chem. Mater.* **2010**, *22*, 6483
- 217 Michaels, C.M.; Keller, J.C.; Stanford C.M. In vitro periodontal ligament fibroblast attachment to plasma-cleaned titanium surfaces. *The Journal of oral implantology*, **1991**, *17(2)*, 132-139
- 218 Permyakova, E.S.; Antipina, L.Yu.; Kovalskii, A.M.; Zhitnyak, I.Y.; Gudz, K. Yu.; Polčák, J.; Sorokin, P.B.; Manakhov, A.M.; Shtansky, D.V. Experimental and Theoretical Study of Doxorubicin Physicochemical Interaction with BN(O) Drug Delivery Nanocarriers, *J. Phys. Chem.*, **2018**, *122(46)*, 26409–26418

- 219 Permyakova, E.S.; Antipina, L.Yu.; Kiryukhantsev-Korneev, Ph.V.; Kovalskii, A.M.; Polčák, J.; Manakhov, A.; Gudz, K.Yu.; Sorokin, P.B.; Shtansky, D.V. Plasma Surface Polymerized and Biomarker Conjugated Boron Nitride Nanoparticles for Cancer-Specific Therapy: Experimental and Theoretical Study, *Nanomaterials*, 2019, 9(12), 1658
- 220 Cokol, M.; Weinstein, Z.B.; Yilancioglu, K.; Tasan, M.; Doak, A.; Cansever, D.; Mutlu, B.; Li, S.; Rodriguez-Esteban, R.; Akhmedov, M.; Guvenek, A.; Cokol, M.; Cetiner, S.; Giaever, G.; Iossifov, I.; Nislow, C.; Shoichet, B.; Roth, F.P. Large-Scale Identification and Analysis of Suppressive Drug Interactions, *Chem. Biol.* **2014**, 21, 541-551
- 221 He, S.; Zhou, P.; Wang, L.; Xiong, X.; Zhang, Y.; Deng, Y.; Wei S. Antibiotic-Decorated Titanium with Enhanced Antibacterial Activity Through Adhesive Polydopamine for Dental/Bone Implant, *J. R. Soc. Interface* **2014**, 11(95), 20140169
- 222 McMillan, J.; Batrakova, E.; Gendelman, H. E. Cell Delivery of Therapeutic Nanoparticles. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 2011, 104, 563– 601
- 223 Desai, M. P.; Labhasetwar, V.; Walter, E.; Levy, R. J.; Amidon, G. L. The Mechanism of Uptake of Biodegradable Microparticles in Caco- 2 Cells is Size Dependent. *Pharm. Res.* 1997, 14, 1568–1573
- 224 Moon, O.M.; Kang, B.C.; Lee, S.B.; Boo, J.H. Temperature Effect on Structural Properties of Boron Oxide Thin Films Deposited by MOCVD Method. *Thin Solid Films* **2004**, 464-465, 164-169
- 225 ASTM Standard D 4187–82 Zeta Potential of Colloids in Water and Waste Water, *American Society for Testing and Materials*, **1985**
- 226 Fursova, O., Potapov, V., Brouchkov, A., Pogorelko, G., Griva, G., Fursova, N., & Ignatov, S. Probiotic Activity of a Bacterial Strain Isolated from Ancient Permafrost Against Salmonella Infection in Mice. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, **2012**, 4(3), 145–153
- 227 Ignatov, S. G.; Andreeva, O. V.; Evdokimova, O. A.; Artzatbanov, V.Yu.; Perelygin, V. V.; Kaprelyants, A. S.; Ostrovskiy, D. N. Study of Repair of Membrane Damage Caused by Low Temperature Freezing of E. coli Cells. *Biokhimiya* 1982, 47, 1621– 1628
- 228 Catalá, A.; Díaz, M. Editorial: Impact of Lipid Peroxidation on the Physiology and Pathophysiology of Cell Membranes. *Front. Physiol.* 2016, 7, 423

- 229 Mateti, S.; Wong, C. S.; Liu, Z.; Yang, W.; Li, Y.; Li, L. H.; Chen, Y. Biocompatibility of Boron Nitride Nanosheets. *Nano Res.* 2018, 11, 334–342
- 230 Emanet Ciofani, M.; Sen, O.; Culha, M. Hexagonal Boron Nitride Nanoparticles for Prostate Cancer Treatment. *ACS Appl. Nano Mater.* 2020, 3, 2364–2372
- 231 Lin, Y.; Williams, T. V.; Xu, T.-B.; Cao, W.; Elsayed-Ali, H. E.; Connell, J. W. Aqueous Dispersions of Few-Layered and Monolayered Hexagonal Boron Nitride Nanosheets from Sonication-Assisted Hydrolysis: Critical Role of Water. *J. Phys. Chem. C* 2011, 115, 2679–2685
- 232 Lobo, V.; Patil, A.; Phatak, A.; Chandra, N. Free rRadicals, Antioxidants and Functional Foods: Impact on Human Health. *Pharmacogn. Rev.* 2010, 4, 118–126
- 233 Aguilera-Correa, J.-J.; Conde, A.; Arenas, M.-A.; de- Damborenea, J.-J.; Marin, M.; Doadrio, A. L.; Esteban, J. Bactericidal Activity of the Ti–13Nb–13Zr Alloy Against Different Species of Bacteria Related with Implant Infection. *Biomed. Mater.* 2017, 12, 045022
- 234 Brouchkov, A., Melnikov, V., Kalenova, L., Fursova, O., Pogorelko, G., Potapov, V., Muradian, K. (2017). Permafrost Bacteria in Biotechnology: Biomedical Applications. *Psychrophiles: From Biodiversity to Biotechnology*, 541–554
- 235 Gudz, K.Y.; Permyakova, E. S.; Matveev, A. T.; Bondarev, A. V.; Manakhov, A. M.; Sidorenko, D. A.; Filippovich, S. Y.; Brouchkov, A. V.; Golberg, D. V.; Ignatov, S. G.; Shtansky, D. V. Pristine and antibiotic-loaded nanosheets/nanoneedles-based boron nitride films as a promising platform to suppress bacterial and fungal infections. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* **2020**, 12(38), 42485–42498
- 236 Turner, N. A.; Sharma-Kuinkel, B. K.; Maskarinec, S. A.; Eichenberger, E. M.; Shah, P. P.; Carugati, M.; Holland, T.L.; Fowler, V. G. Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*: an Overview of Basic and Clinical Research. *Nature Rev. Microbiol.* **2019**, 17, 203–218
- 237 Gabrielyan, L.; Badalyan, H.; Gevorgyan, V.; Trchounian, A. Comparable antibacterial effects and action mechanisms of silver and iron oxide nanoparticles on *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Sci. Rep.* **2020**, 1–12
- 238 Hanini, A.; Schmitt, A.; Kacem, K.; Chau, F.; Ammar, S.; Gavard, J. Evaluation of iron oxide nanoparticle biocompatibility. *Int. J. Nanomed.* **2011**, 6, 787–794

239 Lkhagvajav, N.; Koizhaiganova, M.; Yasa, I.; Çelik, E.; Sari, Ö. Characterization and antimicrobial performance of nano silver coatings on leather materials. *Brazilian J. Microbiol.* **2015**, *46*(1), 41–48

240 Ying, Y.; Zhao, Y.; Hu, X.; Cai, Z.; Liu, X.; Jin, G.; Zhang, J.; Zhang, J.; Liu, J, Huang, X. *In vitro* fluconazole susceptibility of 1.903 clinical isolates of *Candida albicans* and the identification of *ERG11* mutations. *Microb. Drug Resist.* **2013**, *19*(4), 266–73

241 Fursova, O.; Potapov, V.; Brouchkov, A; Pogorelko, G.; Griva, G.; Fursova, N.; Ignatov, S. Probiotic activity of a bacterial strain isolated from ancient permafrost against *Salmonella* infection in mice. *Probiotics Antimicrob. Proteins* **2012**, *4*, 145–153

242 Spear, N.; Aust, S. D. Thiol-mediated NTA-Fe(III) reduction and lipid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* **1994**, *312*, 198–202

243 AL-Jawad, S. M. H.; Sabeeh, S. H.; Taha, A. A.; Jassim, H. A. Synthesis and characterization of Fe-ZnO thin films for antimicrobial activity. *Surf. Rev. Lett.* **2019**, *26*(5), 1850197

244 AL-Jawad, S. M. H.; Taha, A. A.; Salim, M. M. Synthesis and characterization of pure and Fe doped TiO<sub>2</sub> thin films for antimicrobial activity, *Optik*, **2017**, *142*, 42-53

245 Mousavi, S. M.; Hashemi, S. A.; Zarei, M.; Bahrani, S.; Savardashtaki, A.; Esmaeili, H.; Lai, C. W.; Mazraedoost, S.; Abassi, M.; Ramavandi, B. Data on cytotoxic and antibacterial activity of synthesized Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles using *Malva sylvestris*. *Data in brief* **2020**, *28*, 104929

246 Vihodceva, S.; Šutka, A.; Sihtmäe, M.; Rosenberg, M.; Otsus, M.; Kurvet, I.; Smits, K.; Bikse, L.; Kahru, A.; Kasemets, K. Antibacterial activity of positively and negatively charged hematite ( $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) nanoparticles to *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Vibrio fischeri*. *Nanomaterials* **2021**, *11*, 652

247 Prabhu, Y. T.; Rao, K. V.; Kumari, B. S.; Kumar, V. S. S.; Pavani, T. Synthesis of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles and its antibacterial application. *Int. Nano Lett.* **2015**, *5*, 85-92

248 Eid, R.; Arab, N. T. T.; Greenwood, M. T. Iron mediated toxicity and programmed cell death: A review and a re-examination of existing paradigms. *Biochim. Biophys. Acta* **2017**, *1864*(2), 399-430

249 Luo, Q.; Chen, J.; Gan, Y.; Du, J. Intraperitoneal injection of magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> - nanoparticle induces hepatic and renal tissue injury via oxidative stress in mice. *Int. J. Nanomedicine* **2012**, *7*, 4809–4818

250 Gabrielyan, L.; Badalyan, H.; Gevorgyan, V.; Trchounian, A. Comparable antibacterial effects and action mechanisms of silver and iron oxide nanoparticles on Escherichia coli and Salmonella typhimurium. *Sci. Rep.* **2020**, 1–12

251 Hsueh, Y. H.; Tsai, P. H.; Lin, K. S.; Ke, W. J.; Chiang, C. L. Antimicrobial effects of zero - valent iron nanoparticles on gram - positive Bacillus strains and gram - negative Escherichia coli strains. *J. Nanobiotechnology* **2017**, *15*, 1–12

252 Gudkov, S. V; Burmistrov, D. E.; Serov, D. A.; Rebezov, M. B.; Semenova, A. A.; Lisitsyn, A. B. Do iron oxide nanoparticles have significant antibacterial properties? *Antibiotics* **2021**, *10*, 1–23

253 Xu, C.; Akakuru, O. U.; Zheng, J.; Wu, A. Applications of iron oxide-based magnetic nanoparticles in the diagnosis and treatment of bacterial infections. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2019**, *7*, 1–15

254 Zheng, Y.-h.; Cheng, Y.; Bao, F.; Wang, Y.-s. Synthesis and magnetic properties of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles. *Mater. Res. Bulletin* **2006**, *41*(3), 525-529

255 Kojic, E. M.; Darouiche, R. O. Candida Infections of Medical Devices. *Clin. Microbiol. Rev.* **2004**, *17*(2), 255–267

256 Kim, S. H.; Iyer, K. R.; Pardeshi, L.; Muñoz, J. F.; Robbins, N.; Cuomo, C. A.; Koon Ho Wong; Cowen, L. E. Genetic Analysis of Candida Auris Implicates Hsp90 in Morphogenesis and Azole Tolerance and Cdr1 in Azole Resistance. *mBio* **2019**, *10*(1), e02529–18

## ПРИЛОЖЕНИЯ

### ПРИЛОЖЕНИЕ А. АКТЫ БИОЛОГИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЙ



Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав  
потребителей и благополучия человека



**Федеральное бюджетное учреждение науки**

**«Государственный научный центр**

**прикладной микробиологии и биотехнологии»**

п. Оболensk, Серпуховский район, Московская область, 142279

тел: (4967) 36-00-03, факс: (4967) 36-00-10

e-mail: [info@obolensk.org](mailto:info@obolensk.org), <http://www.obolensk.org>

---

### АКТ ИСПЫТАНИЙ ПОКРЫТИЙ НИТРИДА БОРА С АНТИБИОТИКАМИ

Проведены испытания бактериостатического эффекта «наноигльчатых» покрытий нитрида бора (BN) с антибиотиками гентамицин и амфотерицин В различных концентраций, полученными в Национальном исследовательском технологическом университете «МИСиС». В ФБУН ГНЦ ПМБ на испытания было передано 12 групп образцов по 19 образцов в каждой группе:

Группа 1: Подложки монокристаллического кремния кристаллографической ориентации 100 с покрытием BN без антибиотиков, полученные методом химического осаждения из газовой фазы.

Группа 2: Подложки монокристаллического кремния кристаллографической ориентации 100 с покрытием BN, полученные методом химического осаждения из газовой фазы, с 150 мкг/см<sup>2</sup> содержанием гентамицина на поверхности G<sub>150</sub>/BN.

Группа 3: Подложки монокристаллического кремния кристаллографической ориентации 100 с покрытием BN, полученные методом химического осаждения из газовой фазы, с 300 мкг/см<sup>2</sup> содержанием гентамицина на поверхности G<sub>300</sub>/BN.

Группа 4: Подложки монокристаллического кремния кристаллографической ориентации 100 с покрытием VN, полученные методом химического осаждения из газовой фазы, с 20 мкг/см<sup>2</sup> содержанием амфотерицина В на поверхности A<sub>20</sub>/VN.

Группа 5: Подложки монокристаллического кремния кристаллографической ориентации 100 с покрытием VN, полученные методом химического осаждения из газовой фазы, с 150 мкг/см<sup>2</sup> содержанием гентамицина и 100 мкг/см<sup>2</sup> амфотерицина В на поверхности G<sub>150</sub>-A<sub>100</sub>/VN.

Группа 6: Подложки монокристаллического кремния кристаллографической ориентации 100 с покрытием VN, полученные методом химического осаждения из газовой фазы, с 300 мкг/см<sup>2</sup> содержанием гентамицина и 100 мкг/см<sup>2</sup> амфотерицина В на поверхности G<sub>300</sub>-A<sub>100</sub>/VN.

Группа 7: Подложки монокристаллического кремния кристаллографической ориентации 100 без покрытия, использованные в качестве контроля.

Группа 8: Бумажные фильтры, пропитанные 150 мкг гентамицина G<sub>150</sub>/F.

Группа 9: Бумажные фильтры, пропитанные 300 мкг гентамицина G<sub>300</sub>/F.

Группа 10: Бумажные фильтры, пропитанные 20 мкг/см<sup>2</sup> амфотерицина В A<sub>20</sub>/F.

Группа 11: Бумажные фильтры, пропитанные 150 мкг/см<sup>2</sup> гентамицина и 100 мкг/см<sup>2</sup> амфотерицина В G<sub>150</sub>-A<sub>100</sub>/F.

Группа 12: Бумажные фильтры, пропитанные 300 мкг/см<sup>2</sup> гентамицина и 100 мкг/см<sup>2</sup> амфотерицина В G<sub>300</sub>-A<sub>100</sub>/F.

Образцы предварительно стерилизовали УФ-излучением с экспозицией 60 мин на расстоянии 15 см от излучателя. Культивирование микроорганизмов проводили в стерильном культуральном 12-луночном планшете «Corning® Costar®». Микробную взвесь исследуемого штамма готовили путем выращивания на плотной питательной среде Mueller Hinton Agar (HiMedia, Индия) и жидкой питательной среде ГРМБ (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия).

Бактерицидную активность образцов изучали для госпитального штамма *Escherichia coli* K-261, который был выделен из мочи от больного с патологией мочевыделительной системы в отд. Самотек Московской медицинской академии им. И.М. Сеченова, г. Москва, 09.02.2006 г, и для бактериальных штаммов *N. crassa* wt-987, *N. crassa* nit-2 и *N. crassa* nit-6, который был получен из коллекции ФБУН ГНЦ ПМБ (Оболенск, Россия).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что:

1. Все испытуемые группы оказали бактерицидное действие на планктонные клетки *E. coli* К-261 через 3, 8 и 24 ч совместного инкубирования в физиологическом растворе, в зависимости от концентрации и типа антибиотика.
2. Группа 1, 2, 7, 8 не оказали бактериальное действие против штамма *N. crassa* wt-987 и его мутантов nit-2 и nit-6.
3. Группы 4, 5, 6, 10, 11, 12 эффективно ингибировали рост мицелия *N. crassa* wt-987 и его мутантов nit-2 и nit-6.

Директор  
ФБУН ГНЦ ПМБ



И.А. Дятлов

2022 г.



Федеральная служба по надзору в сфере защиты  
прав потребителей и благополучия человека



**Федеральное бюджетное учреждение  
науки**

**«Государственный научный центр**

**прикладной микробиологии и**

п. Оболенск, Серпуховский район, Московская  
область, 142279

тел: (4967) 36-00-03, факс: (4967) 36-00-10

e-mail: [info@obolensk.org](mailto:info@obolensk.org), <http://www.obolensk.org>

## **АКТ ИСПЫТАНИЙ ПОКРЫТИЙ НИТРИДА БОРА С ЧАСТИЦАМИ МЕТАЛЛОВ**

Проведены испытания бактерицидного эффекта покрытий нитрида бора (BN) с наночастицами (НЧ) металлов (Ag, Fe), полученными в Национальном исследовательском технологическом университете «МИСиС». В ФБУН ГНЦ ПМБ на испытания было передано 16 групп образцов по 30 образцов в каждой группе:

Группа 1: Подложки монокристаллического кремния кристаллографической ориентации 100 с покрытием BN, полученные методом химического осаждения из газовой фазы.

Группа 2: Подложки монокристаллического кремния с покрытием BN, с НЧ серебра 6 мкг/см<sup>2</sup> на поверхности, осажденными методом термического разложения BN/Ag6.

Группа 3: Подложки монокристаллического кремния с покрытием BN с НЧ серебра 12 мкг/см<sup>2</sup> на поверхности, осажденными методом термического разложения BN/Ag12.

Группа 4: Подложки монокристаллического кремния с покрытием BN с НЧ серебра 18 мкг/см<sup>2</sup> на поверхности, осажденными методом термического разложения BN/Ag18.

Группа 5: Подложки монокристаллического кремния с покрытием BN с НЧ серебра 25 мкг/см<sup>2</sup> на поверхности, осажденными методом термического разложения BN/Ag25.

Группа 6: Подложки монокристаллического кремния с покрытием BN с НЧ серебра 50 мкг/см<sup>2</sup> на поверхности, осажденными методом термического разложения BN/Ag50.

Группа 7: Подложки монокристаллического кремния с покрытием VN с НЧ серебра 100 мкг/см<sup>2</sup> на поверхности, осажденными методом термического разложения VN/Ag100.

Группа 8: Подложки монокристаллического кремния с покрытием VN с НЧ серебра 100 мкг/см<sup>2</sup> на поверхности, осажденными методом термического разложения VN/Ag100.

Группа 9: Подложки монокристаллического кремния без покрытия, использованные в качестве контроля.

Группа 10: Подложки монокристаллического кремния с покрытием VN с НЧ железа 30 мкг/см<sup>2</sup> на поверхности, осажденными методом восстановления в водороде хлорида железа VN/ Fe30.

Группа 11: Подложки монокристаллического кремния с покрытием VN с НЧ железа 50 мкг/см<sup>2</sup> на поверхности, осажденными методом восстановления в водороде хлорида железа VN/ Fe50.

Группа 12: Подложки монокристаллического кремния с покрытием VN с НЧ железа 150 мкг/см<sup>2</sup> на поверхности, осажденными методом восстановления в водороде хлорида железа VN/ Fe150.

Группа 13: Подложки монокристаллического кремния с покрытием VN с НЧ железа 300 мкг/см<sup>2</sup> на поверхности, осажденными методом восстановления в водороде хлорида железа VN/ Fe300.

Группа 14: Подложки монокристаллического кремния с покрытием VN с НЧ железа 500 мкг/см<sup>2</sup> на поверхности, осажденными методом восстановления в водороде хлорида железа VN/ Fe500.

Группа 15: Подложки монокристаллического кремния с покрытием VN с НЧ железа 700 мкг/см<sup>2</sup> на поверхности, осажденными методом восстановления в водороде хлорида железа VN/ Fe700.

Группа 16: Подложки монокристаллического кремния с покрытием VN с НЧ серебра 70 мкг/см<sup>2</sup> на поверхности, осажденными методом термического разложения VN/Ag70.

Образцы предварительно стерилизовали УФ-излучением с экспозицией 60 мин на расстоянии 15 см от излучателя. Культивирование микроорганизмов проводили в стерильном культуральном 12-луночном планшете «Corning® Costar®». Микробную взвесь исследуемого штамма готовили путем выращивания на плотной питательной среде Mueller Hinton Agar (HiMedia, Индия) и жидкой питательной среде ГРМБ (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что:

1. Группы 5, 6, 7 убивали все клетки *E. coli* K-261, *E. coli* U20 и *S. aureus* MW2 уже через 3 ч. При меньшем содержании Ag антибактериальная эффективность Ag-содержащих образцов уменьшалась.

2. Группа 2, 3, 4 эффективно ингибировали рост штаммов *E. coli* K-261 и U20 в течение 3, 8 ч.

3. Группы 14, 15 показали 99,99% снижение КОЕ *S. aureus* MW2 и 839 КОЕ соответственно уже через 8 часов. Все другие группы с железом, включая исходное покрытие h-VN, убивали все клетки *S. aureus* через 24 часа.

3. Ag-содержащие покрытия VN показали антибактериальную активность в отношении штаммов *S. aureus* MW2 и ATCC25923, *E. coli* K261 и C600, *S. aureus* ATCC25923, *C. parapsilosis* ATCC90018 и *S. auris* CBS10913. В случае *N. crassa* wt наблюдалось частичное ингибирование.

4. Материалы, содержащие Fe, проявляли антибактериальную активность только в отношении *E. coli* K261 и *S. pneumoniae* ATCC33400.

Директор  
ФБУН ГНЦ ПМБ

И.А. Дятлов

2022 г.





Федеральная служба по надзору в сфере защиты  
прав потребителей и благополучия человека



**Федеральное бюджетное учреждение  
науки**

**«Государственный научный центр  
п. Оболенск, Серпуховский район, Московская  
область, 142279**

тел: (4967) 36-00-03, факс: (4967) 36-00-10

## **АКТ ИСПЫТАНИЙ НАНОЧАСТИЦ НИТРИДА БОРА С АНТИБИОТИКАМИ**

Проведены испытания бактериостатического эффекта наночастиц(НЧ) на основе нитрида бора (BN) с антибиотиками гентамицин и амфотерицин В различных концентраций, и с наночастицами серебра, осажденными в процессе ультрафиолетового разложения нитрата серебра, полученными в Национальном исследовательском технологическом университете «МИСиС». В ФБУН ГНЦ ПМБ на испытания было передано 10 групп образцов в виде суспензий 15 мг/мл в каждой группе:

Группа 1: НЧ на основе BN без антибиотиков, полученные методом химического осаждения из газовой фазы.

Группа 2: НЧ на основе BN без антибиотиков, полученные методом химического осаждения из газовой фазы, с наночастицами серебра на поверхности, осажденными методом ультрафиолетового разложения нитрата серебра BN/Ag.

Группа 3: НЧ на основе BN без антибиотиков, полученные методом химического осаждения из газовой фазы, с 1 масс. % содержанием амфотерицина В BN-A1.

Группа 4: НЧ на основе BN без антибиотиков, полученные методом химического осаждения из газовой фазы, с 2 масс. % содержанием амфотерицина В BN-A2.

Группа 5: НЧ на основе BN без антибиотиков, полученные методом химического осаждения из газовой фазы, с 3 масс. % содержанием амфотерицина В BN-A3.

Группа 6: НЧ на основе BN без антибиотиков, полученные методом химического осаждения из газовой фазы, с 4 масс. % содержанием гентамицина BN-G4.

Группа 7: НЧ на основе VN без антибиотиков, полученные методом химического осаждения из газовой фазы, с 6 масс. % содержанием гентамицина VN-G6.

Группа 8: НЧ на основе VN без антибиотиков, полученные методом химического осаждения из газовой фазы, с 8 масс. % содержанием гентамицина VN-G8.

Группа 9: НЧ на основе VN без антибиотиков, полученные методом химического осаждения из газовой фазы, с наночастицами серебра на поверхности, осажденными методом ультрафиолетового разложения нитрата серебра VN/Ag, с 1 масс. % содержанием амфотерицина В VN/Ag -A1.

Группа 10: НЧ на основе VN без антибиотиков, полученные методом химического осаждения из газовой фазы, с наночастицами серебра на поверхности, осажденными методом ультрафиолетового разложения нитрата серебра VN/Ag, с 4 масс. % содержанием гентамицина VN/Ag –G4.

Культуру бактерий выращивали на плотной питательной среде Mueller Hinton Agar (HiMedia). Антибактериальную активность определяли точечным методом. Для каждого тестируемого штамма готовили бактериальную взвесь в физиологическом растворе (9 г/л NaCl) с концентрацией клеток  $10^9$  колониеобразующих единиц в мл (КОЕ/мл) по стандарту мутности. Затем взвеси бактерий разбавляли в 1000 раз, наносили по 100 мкл на плотную питательную среду и тщательно растирали по поверхности ватным тампоном. В течение 15 мин на все планшеты наносили 0,01 мл суспензии наночастиц, обработанных ультразвуком (15 мг/мл). Посевы культивировали при температуре 37°C в течение 24 часов. Антибактериальную активность оценивали по наличию и размеру зоны задержки роста вокруг места нанесения суспензии наночастиц. Все данные были представлены как среднее  $\pm$  стандартное отклонение (SD). Каждый результат представляет собой среднее значение как минимум трех параллельных экспериментов.

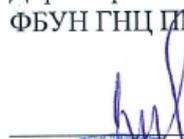
Полученные результаты свидетельствуют о том, что:

1. Группа 1 и чистый раствор гентамицина не оказывают заметного действия на грамположительные и грамотрицательные бактерии. Напротив, группы 6, 7, 8 проявляют сильный бактерицидный эффект в отношении *S. aureus*, *P. aeruginosa* и многих штаммов *E. coli* (A19\*, ATCC25922\*, ATCC35218\*, C600\*, K353\*, K447\*, m3699\*, m59, U, U100\*, U113\*, U114\*, U115, U120\*, U144\*, U15, U166\*, U169\*, U17\*, U170\*, U20\*, U234\*, U43\*, U44\*, U48\*, U54\*, U64\*, U65\*, U66\*, U78\*, U80\*, U84\*, U9, U95\*, U99\*, U99c\*, U99m\*, в том числе с множественной лекарственной устойчивостью (отмечены звездочкой)).

2. Группа 9 эффективно ингибируют рост штаммов *E. coli* A2498, A31, A917, K261, U122, U149, U53, U70 и U96

3. В случае группы 2 размер зоны ингибирования грибов увеличивается в 2-3 раза по сравнению с группами 3,4,5 без Ag за счет выделения ионов Ag<sup>+</sup>. В группе 10 размер зоны угнетения гриба либо увеличивается (*C. albicans*), либо уменьшается (*C. auris*, *C. parapsilosis*, *N. crassa*).

Директор  
ФБУН ГНЦ ПМБ



И.А. Дятлов

2022 г.



Зав. лаб. Нанобиотехнологии  
ФБУН ГНЦ ПМБ

Д.б.н.



С.Г. Игнатов



## **СВИДЕТЕЛЬСТВО О РЕГИСТРАЦИИ НОУ-ХАУ**

На основании «Положения о правовой охране секретов производства (ноу-хау) НИТУ «МИСиС», утвержденного ректором «15» декабря 2015 г., проведена регистрация секрета производства (ноу-хау), созданного в ходе выполнения Соглашения № 20-19-00120 от 20.05.2020 г. между Российским научным фондом, руководителем проекта и организацией о предоставлении гранта на проведение фундаментальных научных исследований и поисковых научных исследований:

### **Способ получения наноструктурированных покрытий гексагонального нитрида бора с антибактериальным эффектом**

Правообладатель: *федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС»*

Авторы: Гудзь Кристина Юрьевна,  
Штанский Дмитрий Владимирович,  
Матвеев Андрей Трофимович

Зарегистрировано в Депозитарии ноу-хау НИТУ «МИСиС»  
№ 08-457-2022 ОИС от “ 29” апреля 2022г

М.П.



Проректор по науке и инновациям

 /М.Р. Филонов/