

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

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

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы:

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 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 или созданию материалов, способных генерировать активные формы 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 трудно контролировать из-за влияния многих факторов, таких как содержание бактерицидного элемента, степень его агрегации, 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 широко 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/см²) и оксида железа (74 мкг/см²) 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 ФБГУН «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^2)), 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.

Достоверность полученных результатов:

Обоснованность и достоверность полученных результатов диссертационной работы подтверждается использованием современного оборудования и современных методик исследований, значительным количеством экспериментальных данных, сопоставлением результатов работы с результатами других авторов.

Личный вклад автора:

Диссертация является законченной научной работой, в которой обобщены результаты исследований, полученные лично автором и в соавторстве. Основная роль в получении и обработке экспериментальных данных, анализе и обобщении результатов принадлежит автору работы. Обсуждение и интерпретация полученных результатов проводилась совместно с научным руководителем и соавторами публикаций. Основные положения и выводы диссертационной работы сформулированы автором.

Структура и объем диссертации:

Диссертационная работа состоит из введения, 5 глав, общих выводов, списка использованных источников.

Во введении описана актуальность проблемы, сформулированы основные задачи, обоснована ее научная новизна и практическая значимость. В первой главе проводится анализ научно-технической литературы, посвященной материалам, применяемым для разработки антибактериальных покрытий и наночастиц, а также рассмотрены стратегии подавления бактериальных и грибковых инфекций. Во второй главе дано описание методов получения используемых в работе материалов, методик исследования и оборудования. В третьей главе описаны результаты исследования структуры и химического состава поверхности покрытий в системе *h*-BN/*Me*/антибиотики и влияния осаждения бактерицидных агентов на состав и свойства поверхностей. В четвертой главе

описаны структура и химический состав поверхности наночастиц в системе *h*-BN/*Me*/антибиотики и влияние бактерицидных агентов на химические и физические характеристики наночастиц. В пятой главе приводятся результаты биологических испытаний покрытий и наночастиц, а также описано взаимодействие наноструктур BN с бактериями и визуализированы результаты.

Диссертация имеет объем 141 страница, включая 16 таблиц, 51 рисунок, список использованных источников из 256 наименований.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении описана актуальность проблемы, сформулированы основные задачи, обоснована научная новизна работы и практическая значимость.

В первой главе представлен аналитический обзор литературы. В первой части обзора приведены данные о современных достижениях в области механизмов подавления бактериальных инфекций различными агентами. Особое внимание уделено стратегиям подавления бактериальной инфекции с помощью антибактериальных покрытий, обеспечивающих бактерицидный эффект за счет механического повреждения стенки бактерий, препятствия адгезии бактерий или высвобождения антибактериальных агентов. Особенно актуальным является разработка бактерицидных поверхностей, способных подавлять бактерии, обладающие множественной лекарственной устойчивостью. Повысить эффективность бактериальной защиты можно за счет одновременного действия нескольких механизмов подавления бактерицидных инфекций.

Во второй части обзора рассмотрены материалы, применяемые для создания антибактериальных наночастиц (НЧ) и методы модификации их поверхности для улучшения антибактериальных характеристик. В последние годы наночастицы с антибиотиками рассматриваются как новый класс антимикробных агентов, которые могут уменьшить проблему с множественными лекарственно-устойчивыми патогенными микробными инфекциями. Обзор литературных данных подтверждает, что НЧ обладают высоким потенциалом для лечения бактериальных инфекций, однако остается несколько нерешенных проблем для их успешного внедрения в клиническую практику. В частности, необходимы дополнительные исследования по установлению механизмов взаимодействия НЧ с бактериальными клетками, приводящих к их гибели,

оптимальной дозы (минимальной ингибирующей концентрации, МИК), кинетики выхода из НЧ бактериального компонента.

В третьей части обзора рассмотрены 2D-материалы, применяемые в биоинженерии. Было выявлено, что благодаря своим уникальным физическим, химическим и механическим свойствам наноструктуры *h*-BN вызывают все больший интерес. Использование НЧ *h*-BN в биомедицинской сфере постоянно расширяется. Цитосовместимость наноструктур BN была подтверждена в ряде работ. Наноносители BN обладают большим потенциалом для терапии рака и доставки бактерицидных агентов. Например, было показано, что НЧ BN с высокоразвитой поверхностью, образованной наночешуйками BN, являются многообещающими платформами для доставки противоракового препарата к опухолевым клеткам (в том числе обладающих множественной лекарственной устойчивостью) и их разрушения. Терапевтическое использование наноразмерных материалов требует тщательного исследования. Этот важный вопрос был в центре внимания недавнего исследования, показывающего, что НЧ BN в концентрации ниже 100 мг/л могут быть использованы в качестве безопасного наноматериала в медицинских целях. Несмотря на эти многообещающие перспективы, использование материалов на основе BN в биомедицине значительно отстает от их аналогов на основе углерода. Однако 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.

Во второй главе рассмотрены используемые в работе методы получения наноструктур и экспериментальные методы исследования.

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 %). Осаждение наночастиц Ag на поверхность покрытий *h*-BN осуществлялось в процессе термического разложения нитрата серебра (AgNO_3). Осаждение наночастиц Fe осуществлялось в процессе восстановления в водороде предварительно осажденного на *h*-BN хлорида железа (FeCl_3). Образцы также загружали сульфатом гентамицина (Белмедпрепараты, Республика Беларусь) и амфотерицином В (Синтез, Российская Федерация). На поверхность образцов наносили различные концентрации антибиотиков, выдерживали в вакууме в течение 120 мин, промывали в дистиллированной воде и высушивали.

НЧ на основе *h*-BN были получены методом химического осаждения из газовой фазы (CVD) в вертикальном реакторе с индукционным нагревом (ВАК ЭТО, Россия). Основным методом синтеза BN является метод химического осаждения при взаимодействии аммиака с парами оксида бора (BO, B₂O₃), образующегося в результате термической диссоциации бороксидного прекурсора (B:MgO:FeO = 3,5:0,1:1). Осаждение серебра (Ag) на поверхность НЧ BN осуществлялось методом ультрафиолетового разложения AgNO₃. НЧ BN и BN/Ag нагружали антибиотиками гентамицин сульфатом (Белмедпрепараты, Республика Беларусь) и амфотерицином В (Synthesis, Россия). Для насыщения НЧ BN и BN/Ag антибиотиками готовили водные суспензии НЧ и добавляли различные количества растворов антибиотиков для получения различных нагрузочных доз. Суспензии инкубировали при комнатной температуре 15 мин. Полученные порошки промывали водой 10 раз с повторным центрифугированием при 9000 об/мин в течение 15 мин.

Морфология поверхностей покрытий и наночастиц была проанализирована методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Также был изучен элементный состав поверхностей с помощью рентгеновского микроанализатора INCAx-sight. Структура образцов была проанализирована методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). Химические связи на поверхности были изучены с использованием ИК-Фурье-спектроскопии в режиме полного внутреннего отражения. Химический состав образцов был проанализирован с помощью рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии (РФЭС). Краевой угол смачивания (КУС) наноструктурированных покрытий был измерен с помощью метода лежащей капли на установке Easy Drop Kruss (KRÜSS, Германия). Кинетика высвобождения антибиотиков была изучена с помощью УФ-спектрофотометра (Ocean Optics, США), а также методом жидкой хроматографии. Концентрация ионов металлов, изучалась методом масс-спектроскопии с индуктивно связанной плазменной с использованием прибора X-Serial II (Thermo Fisher Scientific). Количество генерируемых активных форм кислорода изучали с использованием флуоресцентного спектрофотометра Cary Eclipse (Agilent Technologies).

В третьей главе приведены результаты исследований структуры и химического состава покрытий в системе *h*-BN/Me/антибиотики и исследовано влияние осаждения бактерицидных агентов на состав и смачиваемость поверхностей. Также изучено влияние концентрации металла и антибиотиков на скорость высвобождения бактерицидных агентов из покрытий *h*-BN в фосфатно-солевой буферный раствор.

В качестве исходного материала использовали порошок бора размером от 0,2 до 1 мкм (рисунок 1а). Анализ СЭМ изображений показывает, что покрытия после синтеза состоят из сферических НЧ размером 150-550 нм (рисунок 1б). Увеличенное СЭМ-изображение показывает, что поверхность НЧ образована многочисленными наноиглами/нанолистами (рисунок 1б (вставка)) толщиной от 5 до 15 нм. Анализ энергодисперсионных (ЭДС) спектров (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.%).

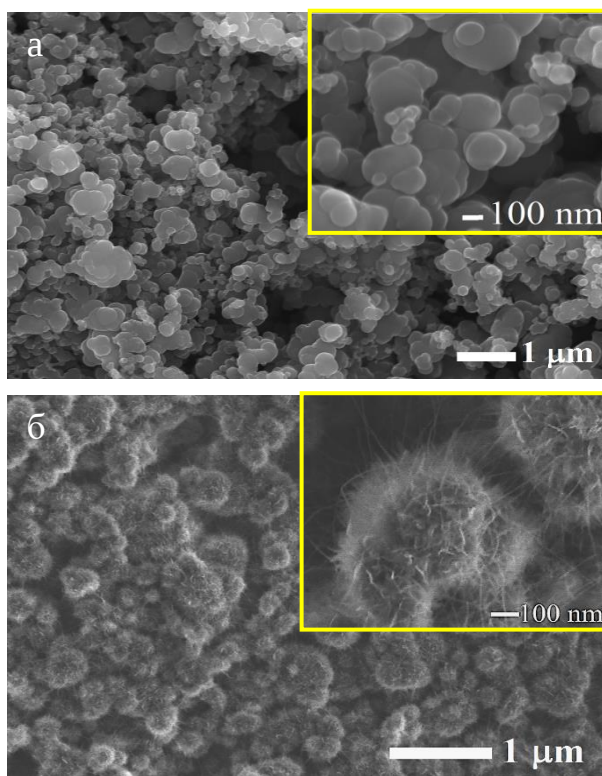


Рисунок 1 – СЭМ-изображения прекурсора порошка В (а) и покрытия BN (б)

На ПЭМ изображениях покрытия BN можно выделить три характерные зоны (рисунок 2а). Структуру ядра (зона 1) можно описать как турбостратный BN (*t*-BN), поскольку он состоит из сильно разупорядоченных sp^2 -связанных нанозерен BN размером в несколько нм. Внутри *t*-BN зафиксированы две структурные модификации BN, а именно *h*-BN и ромбоэдрической BN (*r*-BN), которые отличаются только последовательностью размещения базисных плоскостей. В средней части НЧ (зона 2) наблюдаются базисные плоскости BN ориентированные в основном параллельно

радиусу НЧ (рисунок 2а (левая вставка)). Многочисленные нанопластины и наноиглы толщиной 5-15 атомных слоев сформировали поверхность наночастицы BN, зона 3 (рисунок 2б, г, д). Схематическое строение НЧ BN показано на рисунке 2е.

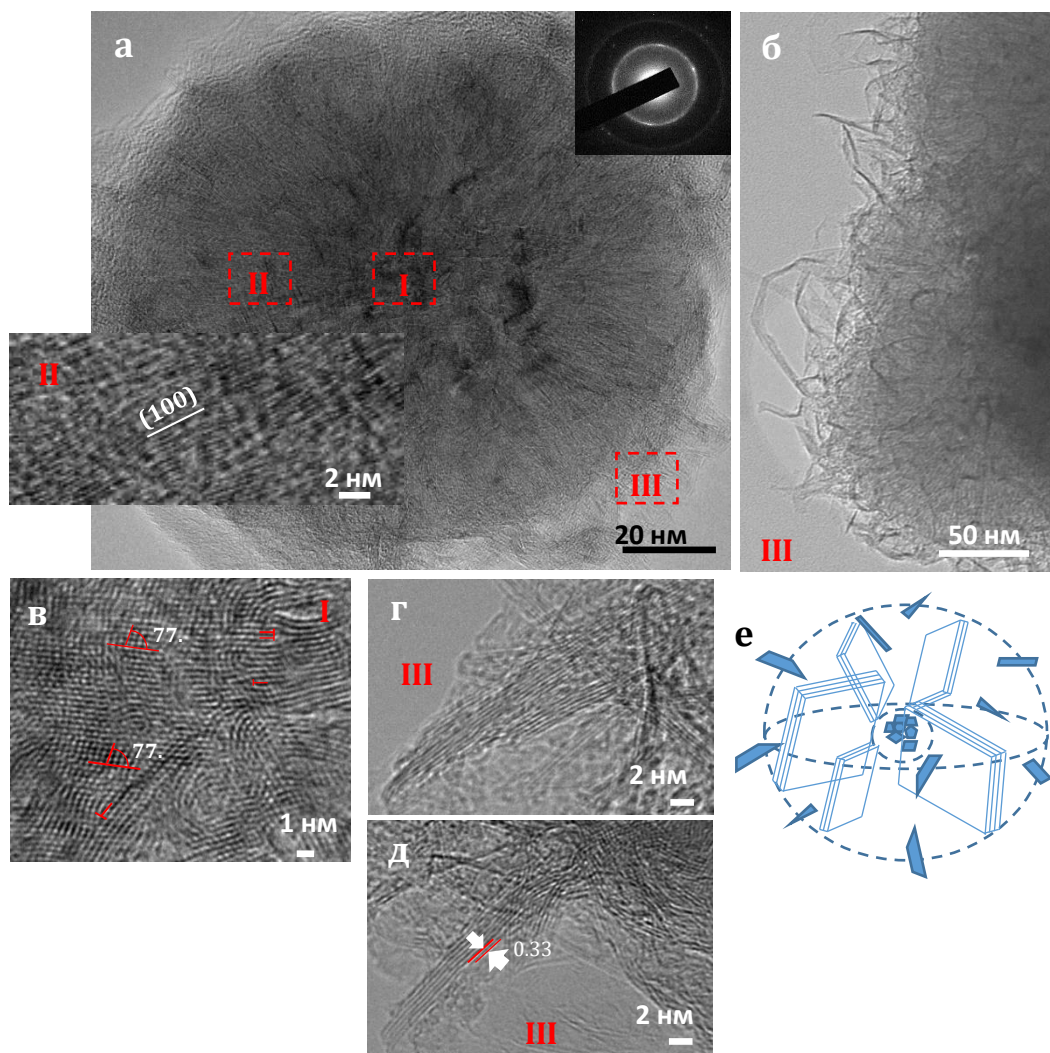


Рисунок 2 – ПЭМ (а, б) и ПЭМ изображения высокого разрешения (в-д) НЧ BN с игольчатой поверхностью, из которых состоит покрытие BN, и схематическое изображение его структуры (е)

Осаждение НЧ Ag подтверждено с помощью ПЭМ и соответствующих ЭДС карт распределения элементов (рисунок 3). Плотность наночастиц Ag увеличивается с увеличением концентрации Ag, в то время как размер заметно не изменяется, находясь в диапазоне от 2 до 6 нм. Морфология фазы на основе Fe на поверхности покрытий *h*-BN была совершенно иной (рисунок 4). Фаза на основе Fe наблюдается либо в виде стержнеобразных НЧ, либо образует тонкую пленку, покрывающую поверхность BN. Локальный ЭДС анализ предполагает образование фазы оксида железа (рисунок 4а).

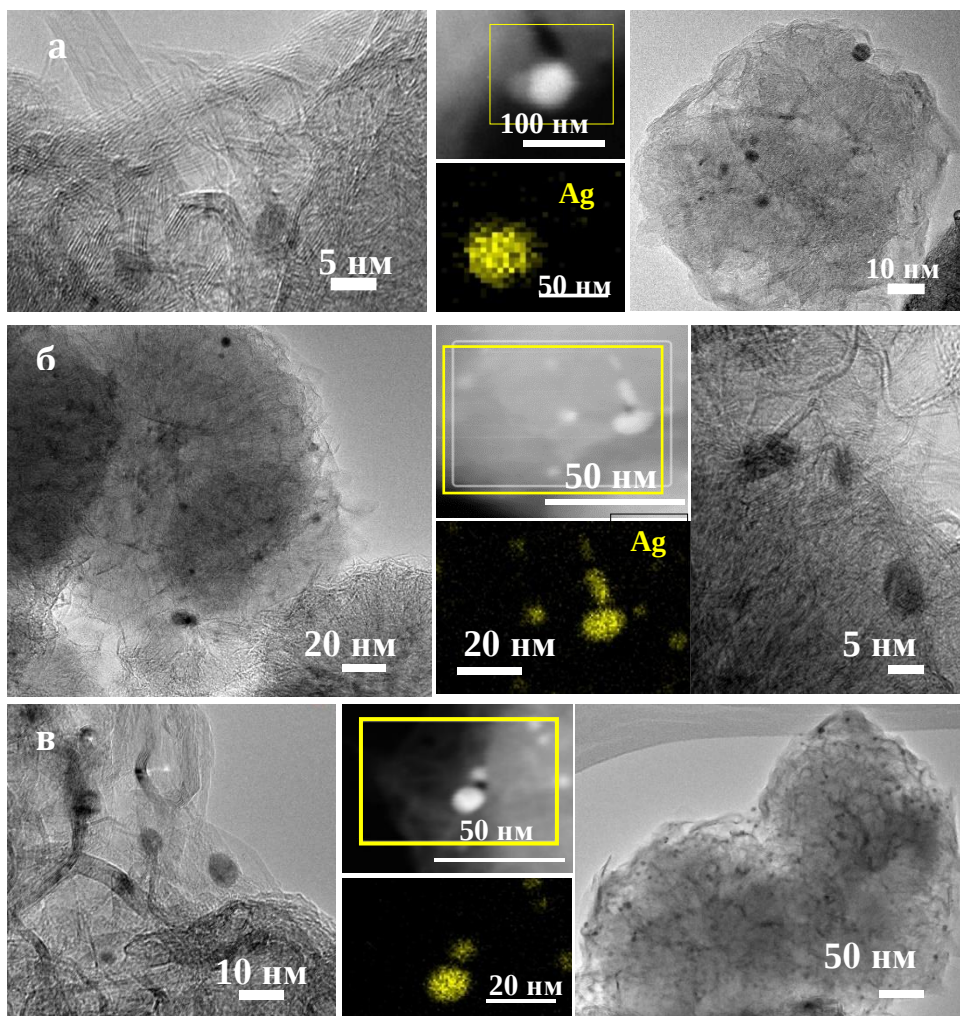


Рисунок 3 – ПЭМ изображения нанокompозитов BN/Ag6 (а), BN/Ag12 (б) и BN/Ag18 (в)

Количество ионов Ag и Fe, вымываемых с поверхностей покрытий Me/*h*-BN в фосфатно-солевой буферный раствор протекает по одинаковому сценарию, зависящему от концентрации элементов: быстрое высвобождение в течение первых 3 ч сопровождается дальнейшим более медленным выделением ионов Ag и Fe. Спустя 24 ч из образцов 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.

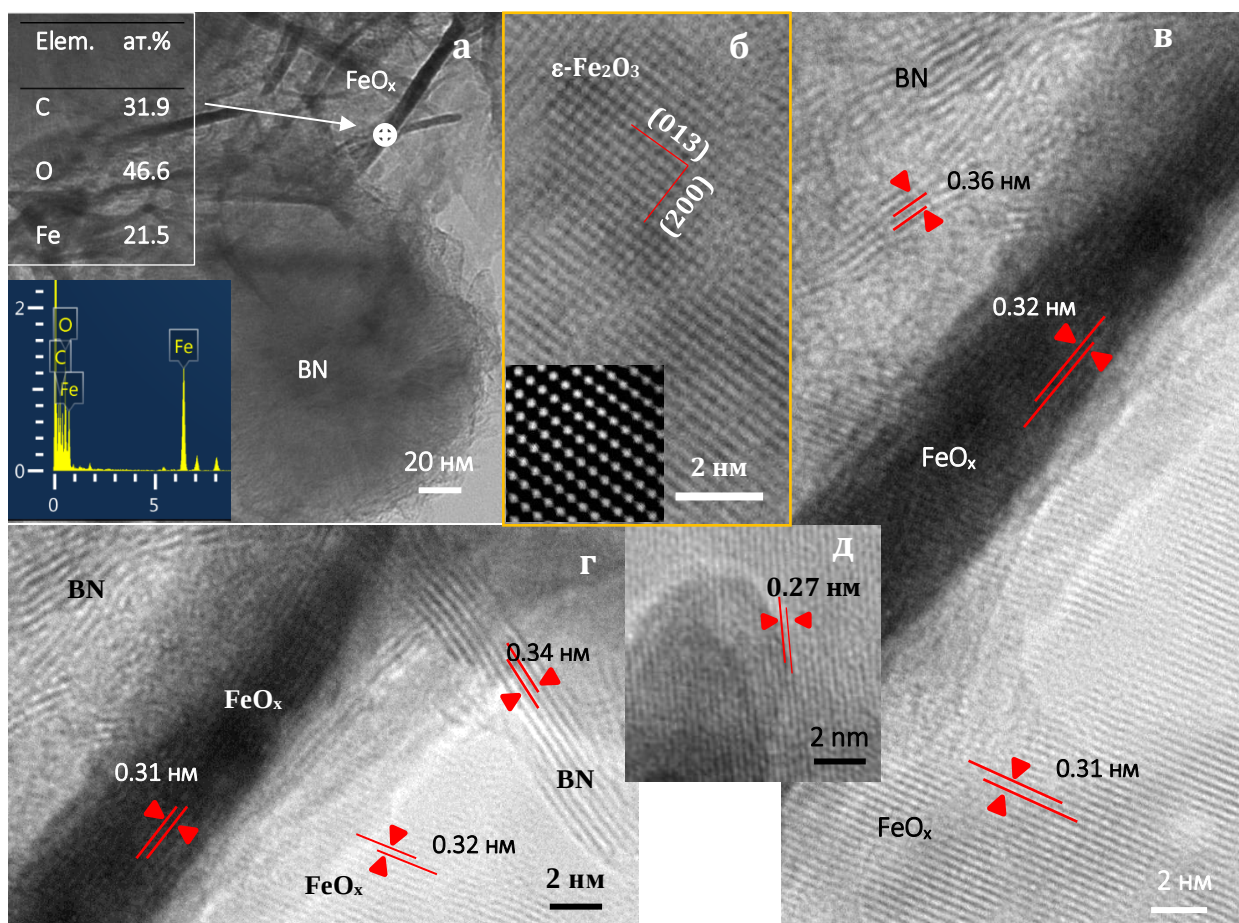


Рисунок 4 – ПЭМ (а) и ПЭМ изображения высокого разрешения (б-д) нанокompозита BN/Fe150. На вставках представлен ЭДС спектр из указанной области (а) и картина электронной дифракции, полученная с использованием обратного преобразования Фурье с ПЭМ изображения высокого разрешения (б)

После обработки антибиотиками поверхность BN окислялась (рисунок 5). По сравнению с РФЭС спектром B1s исходного BN, в образце G₃₀₀/BN наблюдаются два дополнительных компонента при 192,2 эВ (BO) и 194,4 эВ (B(OH)₃). В образце A₂₀/BN идентифицирован только пик B-O/BNO низкой интенсивности, что указывает на то, что он менее окислен из-за более низкой дозы амфотерицина В. Спектр РФЭС C1s образца G₃₀₀/BN был разложен на три компонента: амидная группа NC=O (BE = 288,9 эВ), CO/CN (BE = 286,6 эВ) и алкильная группа C-H_x (BE = 288,9 эВ), каждая из которых входит в состав гентамицина. Спектр РФЭС C1s образца A₂₀/BN был аппроксимирован группами: C(O)O (BE = 290,3 эВ), NC=O (BE = 288,9 эВ), C-O/CN (BE = 286,6 эВ), и C-H_x (BE = 285,0 эВ), входящими в состав амфотерицина В. Спектр РФЭС C1s образца G₃₀₀-A₁₀₀/BN содержит пики, принадлежащие компонентам, входящим в состав обоих антибиотиков: C(O)O (BE = 289,2 эВ) и C=O (BE = 287,6 эВ) – амфотерицин В, а C-O (BE = 286,6 эВ), C-H (BE = 285,0 эВ) и C=C (BE = 284,35 эВ) – амфотерицин В и гентамицин. Таким

образом, результаты РФЭС анализа подтверждают, что оба типа антибиотиков были успешно нанесены на поверхность BN.

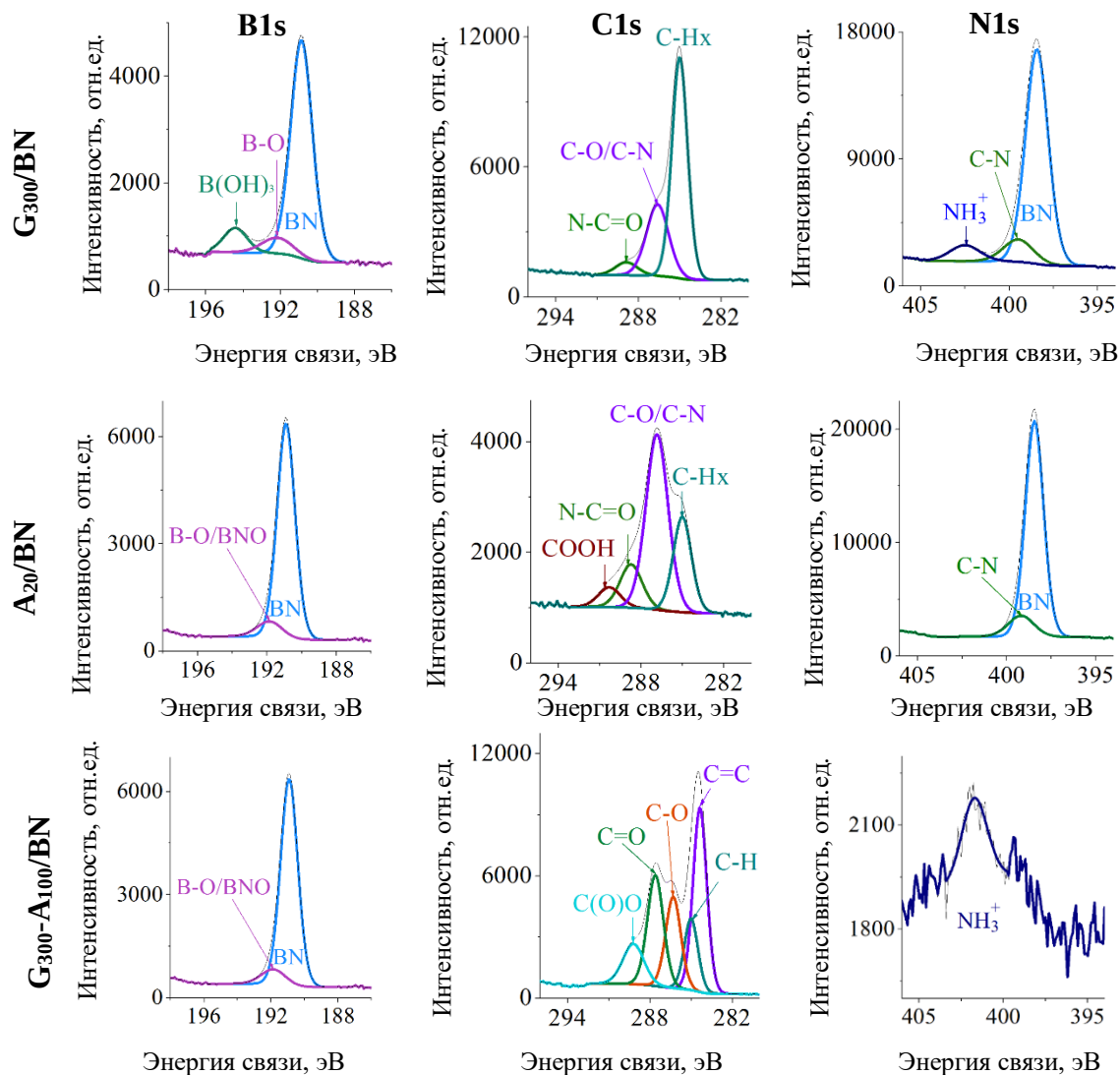


Рисунок 5 - РФЭС спектры покрытий BN с антибиотиками

Согласно результатам исследования высвобождения антибиотиков из покрытий BN в фосфатно-соляной буфер, все образцы демонстрируют схожую кинетику высвобождения лекарственного средства: быстрое растворение поверхностно-связанного лекарственного средства в течении первых 24 ч и замедленное высвобождение инкорпорированного лекарственного средства. Максимальная концентрация гентамицина наблюдалась через 11 дней (285 мкг/мл, G₃₀₀/BN) и 9 дней (142 мкг/мл, G₁₅₀/BN). В случае амфотерицина В (образец A₁₀₀/BN), высвобождение антибиотика наблюдалось в течение 11 дней (максимальная концентрация 93 мкг/мл). Результаты подтверждают, что наноструктурированные покрытия BN обладают высокой

емкостной загрузкой антибиотиков и способны высвобождать терапевтические препараты в течение длительного времени.

Результаты исследований показали, что иммобилизации антибиотиков влияет на смачиваемость покрытий. Поверхность BN после синтеза обладает высокой гидрофобностью, о чем свидетельствует высокое значение краевого угла смачивания (КУС) $133,4^\circ \pm 1,3^\circ$. Нанесение гентамицина незначительно улучшает смачиваемость поверхности. В зависимости от нагрузочной дозы антибиотика, КУС снижается с $105,8^\circ$ (150 мкг/см^2) до $81,7^\circ$ (300 мкг/см^2). Все образцы, пропитанные амфотерицином В, демонстрируют повышенную смачиваемость поверхности. Значения КУС снижаются до $25,4^\circ$ (A_{20}/BN), $7,3^\circ$ (A_{100}/BN), $18,2^\circ$ ($G_{150}-A_{100}/BN$) и $6,9^\circ$ ($G_{300}-A_{100}/BN$). 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 загрузка значительно улучшает смачиваемость.

В четвертой главе исследована структура и химический состав поверхности НЧ в системе $h-BN/Me/$ антибиотики, выявлено влияние концентрации бактерицидных агентов на размер, дзета-потенциал наночастиц и скорость высвобождения бактерицидных агентов в фосфатно-солевой буфер.

Синтезированные НЧ BN и BN/Ag были проанализированы с помощью СЭМ и ПЭМ (рисунок 6). Полые НЧ имеют сферическую форму с тонкой оболочкой (толщина оболочки 20-30 нм) и гладкой поверхностью. Размер НЧ BN находится в диапазоне 60-120 нм, тогда как большинство НЧ ($> 65\%$) имеют размер 90-100 нм. Осаждение НЧ Ag не влияет на размер и морфологию BN. Большая часть наночастиц Ag находится в диапазоне от 3 до 15 нм с редкими более крупными наночастицами, однородно распределенными по поверхности BN.

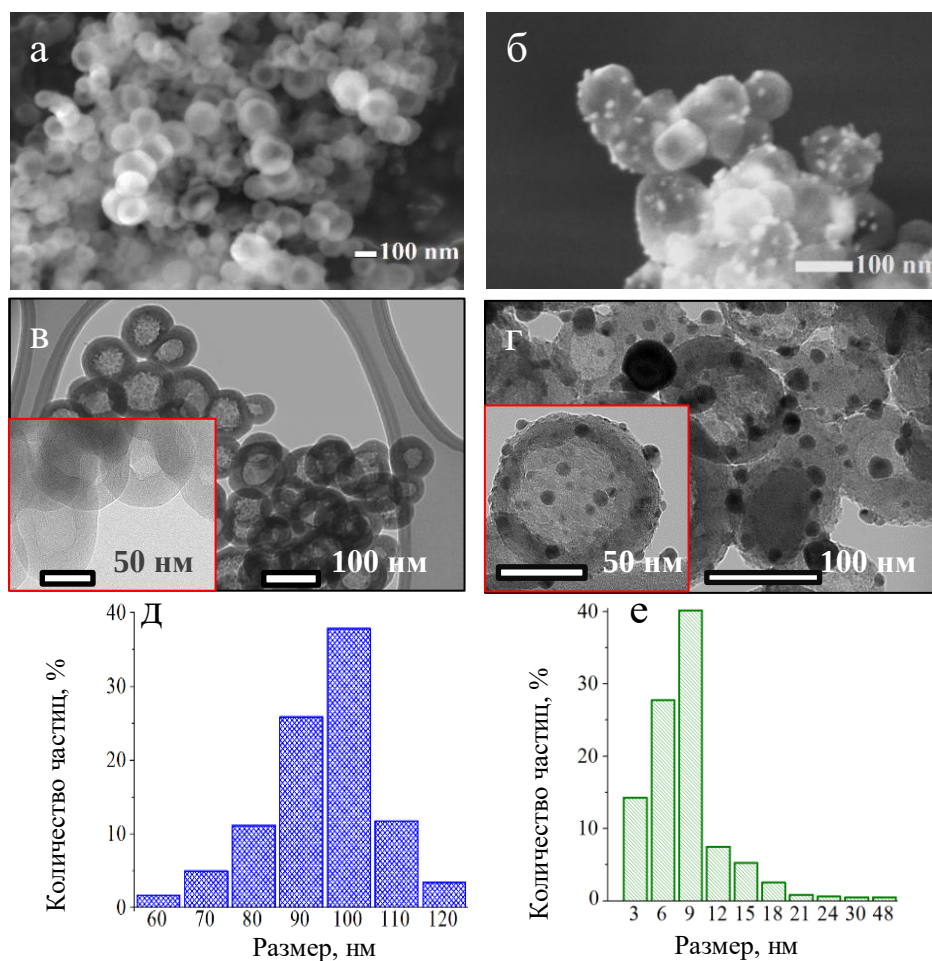


Рисунок 6 – СЭМ (а,б) и ПЭМ (б,г) изображения наноматериалов, гистограмма распределения НЧ BN по размеру (д,е). BN (а,в,д) и BN/Ag (б,г,е).

На ИК-Фурье-спектрах НЧ BN и BN/Ag были зафиксированы два пика высокой интенсивности, которые могут быть приписаны вне плоскостным изгибным колебаниям B-N-B (780 см^{-1}) и плоскостным растягивающим колебаниям B-N (1370 см^{-1}). Небольшой пик при 520 см^{-1} соответствует B_2O_3 и связям O-B-O. На рентгенограммах BN и BN/Ag помимо 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 B_2O_3 (карта ICDD № 00-06-0297). Рентгенограмма образца BN/Ag также показывает характерные пики (111) и (200) Ag (карта ICDD № 00 04 -0783).

Результаты исследования влияния концентрации терапевтических препаратов на дзета-потенциал и размер НЧ BN и BN/Ag показали, что заряд поверхности нагруженных гентамицином НЧ BN постепенно увеличивается с увеличением концентрации антибиотика от -24 мВ до -8 мВ. Для амфотерицина В зависимость обратная: значения

дзета-потенциала уменьшаются от -25 до -35 мВ. Наблюдаемые изменения поверхностного заряда связаны с тем, что гентамицин заряжен положительно из-за большого количества аминогрупп, а амфотерицин В имеет одну группу COOH и 11 групп OH и, следовательно, заряжен отрицательно. Также было показано, что НЧ BN и BN/Ag относительно стабильны вплоть до концентрации антибиотиков 8 масс.%. При увеличении содержания гентамицина наблюдается быстрая агрегация НЧ. Размер НЧ BN, нагруженных амфотерицином В, постепенно увеличивается с увеличением концентрации антибиотика. Поэтому с учетом размера частиц и значений их дзета-потенциала, а также результатов предварительных антибактериальных испытаний, для дальнейших исследований были выбраны следующие концентрации терапевтических препаратов: 4, 6 и 8 масс.% (гентамицин) и 1, 2 и 3 масс.% (амфотерицин В).

РФЭС-анализ был использован для определения химических связей и элементного состава загруженных антибиотиками НЧ BN и BN/Ag. Помимо основных пиков, принадлежащих фазе BN, РФЭС-спектры B1s показывают связи В–О при 192,2 эВ. Отношения пиков В–О/BN в образцах BN/Ag-G4 и BN/Ag-A1 были ниже по сравнению с их аналогами, без Ag, что указывает на то, что образцы, не содержащие Ag, более окислены. Спектр РФЭС C1s образцов BN-G4 и BN/Ag-G4 был разложен на три компонента, входящих в состав гентамицина: алкильные группы C-H ($\text{BE} = 285,0$ эВ), C-O/C-N ($\text{BE} = 286,61$ эВ) и амид NC=O ($\text{BE} = 288,74$ эВ). РФЭС-спектр C1s образцов BN-A1 и BN/Ag-A1 имеет три характерных пика, принадлежащих компонентам амфотерицина В: амидам N-C=O ($\text{BE} = 288,74$ эВ), C-O/C-N ($\text{BE} = 286,61$ эВ) и алкильным группам C-H ($\text{BE} = 285,0$ эВ). О металлическом серебре в образцах BN/Ag-G4 и BN/Ag-A1 свидетельствует наличие двух характерных пиков $\text{Ag3d } 5/2$ (368,74 эВ) и $\text{Ag3d } 3/2$ (374,77 эВ). Таким образом, успешная загрузка гентамицина и амфотерицина В в НЧ BN и BN/Ag была подтверждена анализом РФЭС.

Результаты исследования высвобождения антибиотиков из НЧ BN и BN/Ag в фосфатно-солевой буферный раствор с течением времени показали, что характер высвобождения зависит от дозы: чем выше нагрузочная доза, тем выше концентрация антибиотика и более длительное высвобождение. Максимальное количество гентамицина достигается через 7 дней (490 мкг/мл для BN-G4) и 9 дней (784 мкг/мл для BN-G6, 942 мкг/мл для BN-G8, 520 мкг/мл для BN/Ag-G4). Максимальное кумулятивное количество амфотерицина В через 7 дней составляет 301 (BN-A3), 215 (BN-A2), 91 (BN-A1) и 95 (BN/Ag-A1) мкг/мл. В случае низкой дозы, приблизительно 81% (BN-A1) загруженного антибиотика высвобождаются в течение первого дня.

Наиболее интенсивное выделение ионов Ag с поверхностей НЧ BN в фосфатно-солевой буферный раствор 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 значительно замедлялось и заканчивалось через 5 дней. Образцы BN/Ag, нагруженные гентамицином и амфотерицином В, демонстрируют схожую кинетику высвобождения ионов Ag. Через 1 и 7 дней концентрация ионов Ag в растворе составляет 220-240 и 375 мкг соответственно.

В пятой главе приведены результаты испытаний на бактерицидную и фунгицидную активность, изучения механизмов взаимодействия наноструктур с бактериями *E.coli*, а также исследования генерации АФК. Бактерицидная и фунгицидная активность была изучена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии».

Исходные покрытия BN продемонстрировали значительную антибактериальную активность. Результаты ПЭМ исследований областей контакта бактерий с поверхностью покрытий показали, что мембраны клеток *E. coli* повреждаются наноструктурированной поверхностью BN, что приводит к гибели клеток. Скорость инактивации бактерий штамма *E. coli* K-261 наноструктурами BN сравнима с терапевтическим эффектом гентамицина при его МИК. Все образцы покрытий с иммобилизованными антибиотиками на поверхности покрытий также показали выраженные бактерицидные и фунгицидные свойства в отношении бактериального штамма *E. coli* K-261 и грибов wt-987 и мутантов nit-2 и nit-6 аскомицета *N. crassa*. Покрытия BN, легированные Fe, показали четкую зависимость: чем выше содержание Fe, тем сильнее бактерицидный эффект. Результаты показывают, что МИК оксида железа составляет 74 мкг/см² для эффективного подавления штаммов *E. coli* K-261, *E.coli* U20, *S. aureus* MW2, *S. aureus* 839 и *C parapsilosis* ATC900018 при их исходной концентрации 10⁴ КОЕ/мл. 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. Так, при достижении 99,99% бактерицидного действия в отношении штаммов *E. coli* K-261, *E.coli* U20, *S. aureus* MW2 и *S. aureus* 839. МИК Ag в покрытиях BN/Ag составляет 12 мкг/см², что на порядок ниже, чем для оксида железа.

Согласно результатам проведенных биологических испытаний, нагруженные гентамицином НЧ проявляют сильный бактерицидный эффект. Важно отметить, что даже образцы BN-G4 с минимальной нагрузочной дозой гентамицина (4 масс.%) проявляют значительный бактерицидный эффект. Нагруженные антибиотиками НЧ BN проявляют бактерицидную активность в отношении штаммов *S. aureus* B8469, *S. aureus*

MW2, *P. aeruginosa* ATCC27853, *P. aeruginosa* B1307/17 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*, U99с*, U99m*, в том числе с множественной лекарственной устойчивостью (отмечены звездочкой)). Против штаммов *E. coli* (A2498, A31, A917, K261, U122, U149, U53, U70, U78) оказались эффективны наногибриды BN/Ag. Таким образом, использование нагруженных антибиотиками НЧ BN/Ag обеспечивает широкую бактерицидную защиту от всех изученных патогенов. СЭМ исследования демонстрирует разрушение клеточной стенки при контакте с образцами BN-G4 и BN/Ag. Кроме того, образцы BN и BN/Ag, нагруженные амфотерицином В проявляют высокую фунгицидную активность в отношении штаммов *C. albicans* ATCC24433, *C. albicans* ATCC90028, *C. auris* CBS109113, *C. Parapsilosis* ATCC90018 и *N. crassa* wt.

ВЫВОДЫ

1. Методом CVD 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/см²) и амфотерицином В (20 и 100 мкг/см²). Показано, что высвобождение антибиотиков из покрытий в фосфатно-солевой 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* K-261. 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/см²) и амфотерицина В (100 мкг/см²). 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 грамотрицательные устойчивые к антибиотикам бактерии кишечной палочки (*E.coli*) погибают в результате их механического повреждения при контакте с наноструктурированной поверхностью покрытия *h*-BN, состоящей из наноигл и нанопластин. Показано, что бактерицидный эффект *h*-BN (снижение колоний-образующих элементов (КОЕ) на 99,99% при исходной концентрации клеток кишечной палочки 10^4 клеток/мл и на 90% при 10^6 клеток/мл) сопоставим с токсическим эффектом от гентамицина, высвобождающегося из *h*-BN при его МИК (150 мг/л).

3. Получены сферические полые НЧ 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 НЧ BN и BN/Ag, а также значений МИК антибиотиков, определены оптимальные концентрации загружаемого в НЧ 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 НЧ BN и BN/Ag в фосфатно-солевой буферный раствор, зависят от дозы загрузки: чем выше доза, тем выше концентрация и более продолжительный выход. Быстрый выход ионов Ag^+ из образцов BN/Ag в течение первых нескольких часов сменяется более медленным высвобождением ионов в течение следующих нескольких дней. Биологические испытания показали, что НЧ 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*, НЧ BN, легированные Ag, и гибридные НЧ BN/Ag с гентамицином, продемонстрировали превосходную бактерицидную активность. Также установлена высокая фунгицидная активность нагруженных амфотерицином В НЧ BN и BN/Ag, а также наногибридов BN/Ag против бактериальных штаммов *C. albicans*, *C. auris*, *C. parapsilosis* и грибов *N. crassa*.

4. Гибридные покрытия BN/Ag и BN/Fe были успешно получены путем реакции взаимодействия газообразного аммиака с прекурсором аморфного бора при 1300°C с последующим термическим разложением AgNO_3 при 350°C или восстановлением FeCl_3 в водороде при 350°C . Наноструктурированные покрытия BN

состояли из сферических НЧ *h*-BN размером 100–300 нм, поверхность которых образована многочисленными нанолепестками/наноиглами *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 γ -Fe₃O₄ и ϵ -Fe₂O₃. Поверхностная модификация покрытий *h*-BN НЧ 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 24 ч. После УФ-облучения в течение 1 часа покрытия BN/Ag и BN/Fe генерируют АФК, 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 МИК оксида железа составляет 74 мкг/см² 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 BN/Ag проявляют сильный бактерицидный эффект при более низкой концентрации Ag по сравнению с оксидом железа. Образец с 25 мкг/см² 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/см² для полного подавления штаммов *E. coli* K-261, *E. coli* U20, *S. aureus* MW2 и *S. aureus* 839.

СПИСОК ОСНОВНЫХ ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в журналах, рекомендованных ВАК и входящие в базы данных Web of Science и Scopus:

1. **Kotyakova(Gudz) K.Yu.**, 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 APPLIED MATERIALS & INTERFACES, 12 (38) 2020, pp. 42485-42498, DOI: 10.1021/acsami.0c10169

2. **K. Yu. Kotyakova(Gudz)**, E. S. Permyakova, A. T. Matveev, A. M. Kovalsky, S. Yu. Filippovich, P. V. Slukin, S. G. Ignatov, D. V. Shtansky Desorption Properties and

Bactericidal and Fungicidal Activity of Nanostructured Coatings Based on Hexagonal Boron Nitride Saturated with Therapeutic Preparations, Russian Nanotechnologies, 15 (7-8) 2020, p. 445–450, DOI: 10.1134/S1995078020040047

3. **К. Ю. Котякова(Гудзь)**, L.Yu.Antipina, E.S.Permyakova, A.M. Kovalskii, A.S. Konopatsky, S.Yu. Filippovich, I.A. Dyatlov, P.V. Slukin, S.G. Ignatov, D.V. Shtansky Ag-Doped and Antibiotic-Loaded Hexagonal Boron Nitride Nanoparticles as Promising Carriers to Fight Different Pathogen, ACS Appl. Mater. Interfaces 2021, 13, 20, 23452–23468, DOI: 10.1021/acsaami.1c03775

Результаты интеллектуальной деятельности:

Котякова(Гудзь) К.Ю., Матвеев А.Т., Штанский Д.В., «Способ получения наноструктурированных покрытий гексагонального нитрида бора с антибактериальным эффектом». Свидетельство о регистрации секрета производства (ноу-хау), ОИС от 21 февраля 2022, Депозитарий ноу-хау НИТУ «МИСиС».

Публикации в материалах научно-технических конференций:

1. **Котякова(Гудзь) К.Ю.** Разработка биосовместимого покрытия и основе нитрида бора для борьбы с инфекциями. Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2019» / Отв. ред. И.А. Алешковский, А.В. Андриянов, Е.А. Антипов. [Электронный ресурс]. – М: МАКС Пресс, 2019. ISBN 978-5-317-06100-5

2. **Котякова(Гудзь) К.Ю.** Разработка и получение антибактериальных покрытий на основе нитрида бора, насыщенных бактерицидными компонентами// Сборник трудов XVI Российской ежегодной конференции молодых научных сотрудников и аспирантов «Физико-химия и технология неорганических материалов» (Москва. 1 - 4 октября 2019 г.) / ИМЕТ РАН. – Москва, 2019. – С. 183

3. **Котякова(Гудзь) К.Ю.** Получение наноструктурированного антибактериального покрытия широкого спектра действия на основе нитрида бора/ Сборник трудов XVII Российской ежегодной конференции молодых научных сотрудников и аспирантов «Физико-химия и технология неорганических материалов» (10 – 13 ноября 2020 г.) / ИМЕТ РАН. – Москва, 2020. – С. 125

4. **Котякова(Гудзь) К.Ю.** Разработка наночастиц на основе гексагонального нитрида бора легированных бактерицидными компонентами для борьбы с инфекциями / Сборник трудов Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2021» /Отв.ред. И.А. Алешковский, А.В. Андриянов, Е.А. Антипов, Е.И. Зимакова – М.: МАКС Пресс, 2021. ISBN 978-5-317-06593-5

5. **Котякова(Гудзь) К.Ю.** Разработка наночастиц нитрида бора, допированных серебром и антибиотиками, для борьбы с различными патогенами/ Сборник трудов XVIII Российской ежегодной конференции молодых научных сотрудников и аспирантов «Физико-химия и технология неорганических материалов» (30 ноября - 03 декабря 2021 г.) / ИМЕТ РАН. – Москва, 2021. – С. 120

6. **Котякова(Гудзь) К.Ю.** Бактерицидные наночастицы на основе гексагонального нитрида бора/ Физика конденсированных состояний: сб. тезисов II Международной конференции (Черноголовка, 31 мая – 4 июня 2021 г.) / под ред. Б.Б. Страумала. – Черноголовка, 2021. – С. 181. – ISBN 978-5-6045956-0-2 KFS-2 (Осипьян). DOI:10.26201/ISSP.2020/FKS 2.059.