

УДК 615.281.9:542.057[546/47+546/56/.57]-022.532+547.995]

УКПП

№ держреєстрації 0118U003577

Інв. №

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

СУМСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

40007, м.Суми, вул. Р.Корсакова, буд. 2

e-mail:a.loboda@med.sumdu.edu.ua

ЗАТВЕРДЖУЮ

Проректор з наукової роботи

д-р фіз.-мат.наук,професор

А.М. Чорноус

ЗВІТ

ПРО НАУКОВО-ДОСЛІДНУ РОБОТУ

**ЕФЕКТИВНІСТЬ ПРОТИМІКРОБНОЇ ДІЇ
НАНОКОМПОЗИТНИХ КОМПЛЕКСІВ (ХІТОЗАН-НАНОМЕТАЛИ)
ВІДНОСНО ПОЛІРЕЗИСТЕНТНИХ КЛІНІЧНИХ ІЗОЛЯТІВ**

(проміжний)

Керівник НДР,

д.мед.н., доцент

А.М. Лобода

Суми – 2019

Рукопис закінчено 20 грудня 2019 р.

Результати роботи розглянуто науковою радою, протокол №бвід 26.12.2019р.

СПИСОК АВТОРІВ

Керівник НДР, директор МІ СумДУ д.мед.н., доцент	(20.12.2019)	А.М. Лобода (реферат, вступ, висновки)
Відповідальний виконавець Заступник директора МІ СумДУ К.мед.н., доцент	(20.12.2019)	В.М. Голубнича (реферат, вступ, розділ 1, 2)
Старший науковий співробітник К.мед.н.	(20.12.2019)	В.В. Корнієнко (розділ 1, 3)
Науковий співробітник	(20.12.2019)	Р.В.Вітер (розділ 1)

РЕФЕРАТ

Звіт про НДР: 60 с. 5 табл., 25 рис., 82 джерела

АНТИБАКТЕРІАЛЬНА ДІЯ, ХІТОЗАН, НАНОМЕТАЛИ, АНТИБІОТИКОРЕЗИСТЕНТНІСТЬ, КЛІНІЧНІ ІЗОЛЯТИ

Об'єкт дослідження – антибіотикорезистентність та антибактеріальні властивості.

Предмет дослідження – механізми антибактеріальної дії та ефективність нанокompatитних комплексів (хітозан-нанометали) відносно полірезистентних штамів мікроорганізмів.

Метою проекту є встановлення механізму дії та ефективності нанокompatитів складу «хітозан-нанометали» стосовно найрозповсюдженіших антибіотикорезистентних клінічних ізолятів.

Методи дослідження – в роботі використовувався мультидисциплінарний підхід із залученням класичних методик в галузі хімії, біоматеріалів, мікробіології та клінічної медицини.

Результати та їх новизна

Під час виконання НДР здійснено синтез наночасточок срібла, міді, та оксиду цинку із застосуванням різних видів синтезу та різних стабілізуючих компонентів вивчено їх фізико-хімічні властивості. Встановлено режими, які дозволяють отримати частинки із контрольованим розміром та дисперсністю у розчині, та відібрано найкращі зразки для подальших досліджень. Створено комплекси хітозан-нанометалита досліджено фізико-хімічних характеристики розчинів. Вивчено їх стабільність у часовому проміжку та за умов впливу фізичних факторів. Проведено модифікацію гелів хітозану із застосуванням методик крослінкінгу та використано електропрядіння для створення нановолокон із хітозану та хітозан-нанометали композитних матеріалів.

Визначена антибактеріальна активність нанометалів, самотійно та у комплексах із хітозаном та гідроксиапатитом, без та після обробки ультразвуком, по

відношенню до антибіотикорезистентних мікроорганізмів з групи ESKAPE та *E.coli*. Було встановлено концентрації, які викликають інгібування планктонних форм мікроорганізмів та утворення ними біоплівки, а також концентрації, які викликають руйнацію уже сформованих біоплівок.

Досліджено особливості впливу нанокompозитів на різні структури бактеріальної клітини і визначено основні механізми дії. Визначено особливості впливу нанометалів та їх композитів на формування біоплівок та на морфологію раніше утворених біоплівок.

ЗМІСТ

	С.
Скорочення та умовні позначки	6
Вступ	7
1 Огляд літератури	8
2 Об'єкти і методи дослідження	17
2.1 Матеріали	17
2.2 Синтез наночастинок срібла	17
2.3 Синтез наночастинок міді	18
2.4 Синтез наночастинок ZnO	19
2.5 Синтез наночастинок гідроксиапатиту	20
2.6 Синтез та характеристика хітозану	21
2.7 Функціоналізація ZnO-NR білками та оцінка імуносенсорної відповіді	24
2.8 Фізико-хімічна характеристика отриманих зразків	26
2.9 Обробка наночастинок ультразвуковими хвилями	27
2.10 Оцінка антибактеріальної активності наночастинок Ag, Cu, ZnO та їх композитів проти полірезистентних штамів ESKAPE	27
2.11 Статистична обробка результатів	28
3 Результати дослідження	29
Висновки	51
Перелік джерел посилання	52

СКОРОЧЕННЯ ТА УМОВНІ ПОЗНАЧКИ

НЧ– наночастинки

МІК – мінімальна інгібуюча концентрація

ESKAPE- *Enterococcus faecium*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* та *Enterobacter spp.*

ВООЗ – всесвітня організація охорони здоров'я

ПВП – полівініл піролідон

ЕГ – етиленгліколь

ГДС – газоподібна дисперсія

ГА – гідроксиапатит

ШПВП – швидкість пропускання водяної пари

СБФ – субстратний буфер

СЕМ – скануюча електронна мікроскопія

ПАГ – поліамід гідрохлорид

ТЕМ – трансмісивна електронна мікроскопія

ВСТУП

Інфекції є однією із головних причин захворюваності та смертності упродовж усієї історії людства. Винахід антибіотиків призвів до суттєвого зниження смертності та частоти ускладнень спричинених інфекційними патогенами [1]. Однак, неконтрольоване застосування цих препаратів призвело до появи антибіотикорезистентності [2]. У своїй статті L. Founou [3] зазначив, що антибіотики стали «зникаючими видами», через швидке поширення антибіотикорезистентності у всьому світі [4].

Спроби вирішення даної проблеми проводяться у різних напрямках. Одним із перспективних шляхів у боротьбі зі зростаючою полірезистентністю є пошук нових засобів з антимікробною активністю [5]. Метали та їх оксиди використовували у якості антимікробних засобів з давніх часів, однак винахід антибіотиків призвів до їх витіснення із медичної практики. Розвиток нанотехнологій надав нового поштовху до використання металів у якості антимікробних засобів [6]. Численні дослідження свідчать про наявність антимікробних властивостей у нанометалів [7], тому їх вважають альтернативою для антимікробних засобів і передбачають їх широке біомедичне використання. Окрім того, нанометали можуть бути використані для діагностики, транспортування низки терапевтичних препаратів [8].

Для синтезу наночастинок застосовують фізичний, хімічний та біологічний методи, кожний з яких має певні переваги та недоліки. Для зменшення токсичного впливу нанометалів на клітини та довколишнє середовище розробляються нові підходи до отримання часточок та проводиться пошук способів зниження їх токсичності [9]. З огляду на все перераховане, метою нашого дослідження було вивчити фізико-хімічні характеристики наночастинок, отриманих із застосуванням різних методів, дослідити їх антимікробні властивості та механізми дії, як в чистому вигляді, так і в поєднанні з хітозаном та іншими металами.

1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Запровадження вакцинації, винахід антибіотиків, удосконалення санітарно-гігієнічних умов життя призвело до суттєвого зниження рівня захворюваності та смертності від інфекційних хвороб. Однак, згідно даних ВООЗ, серед основних 10 причин смертності у світі три мають інфекційну етіологію [10]. Згідно зі статистичними даними Центру громадського здоров'я України, протягом останніх 20 років спостереження, інфекційні хвороби щорічно вражали від 7 до 10 млн. мешканців України [11]. Єдиним варіантом етіотропної терапії, який дозволяє приборкати інфекційний процес, попередити розвиток ускладнень, та сприяє швидкому покращенню стану пацієнтів [1], залишаються антибіотики.

Винахід антибіотиків був одним із найважливіших відкриттів в історії людства, яке дозволило різко знизити рівень смертності та ускладнень, спричинених інфекціями, значно покращити якість життя та суттєво збільшити тривалість життя. Однак, з часів відкриття антибіотиків ставлення людства до них перетворилося з "чарівної таблетки" на "ліки призначення яких потребує особливої уваги". Хоча спостерігається значне зростання кількості використаних антибіотиків за останні десять років, більшість фармацевтичних компаній утратили зацікавленість до розробки нових препаратів [2]. Основною причиною таких кардинальних змін є поява та поширенням стійких до антибіотиків штамів мікроорганізмів та зумовлене цим значне зниження ефективності антимікробних препаратів [12]. Розробка нових препаратів вимагає значних фінансових інвестицій, є довготривалим процесом і часто вже через 2-3 роки після виходу препарату на ринок реєструються резистентні штами. Антибіотикорезистентність пов'язують із поширенням вроджених та набутих захисних механізмів в популяції мікроорганізмів [13].

Вчені виділяють групу найбільш проблемних збудників (*Enterococcus faecium*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*,

Pseudomonas aeruginosa та *Enterobacter spp.*), які здатні найбільш ефективно уникати дії протимікробних препаратів, та називають їх ESKAPE [14]. Збудники ESKAPE мають високу здатність до колонізації різних поверхонь та формування біоплівки на імплантатах, медичних апаратах, обладнанні для надання першої медичної допомоги [15]. Біоплівка – це організована сукупність мікроорганізмів, яка вважається одним із найбільш широко розповсюджених та успішних способів життя на Землі [16]. Ці властивості біоплівки сприяють розвитку ускладненого перебігу інфекційних захворювань та зростанню стійкості мікробів до протимікробної терапії [17]. Кілька авторів продемонстрували, що мікроорганізми в біоплівках більш стійкі до антимікробних препаратів, ніж планктонні клітини [18]. Ефективність існуючих антимікробних сполук у пригніченні або знищенні біоплілкових мікробів недостатня [19]. Це стало глобальною загрозою для системи охорони здоров'я, а також спровокувало інтенсивний пошук нових препаратів з антимікробною активністю. Вимоги до антибактеріальних засобів стають все вищими, а використання різних протимікробних засобів у медицині та фармації обмежене їх безпекою. Перспективним напрямком у боротьбі зі зростаючою полірезистентністю є пошук нових ефективних протимікробних препаратів, які володіють множинними механізмами дії.

Останнім часом пильна увага науковців приділяється нанотехнологіям та наночастинкам [20] (НЧ), як хорошій альтернативі звичайним матеріалам. Існує величезна кількість різних за походженням, розміром, формою, способом організації молекул наноматеріалів. Основною відмінністю наноматеріалів від звичайних є залежність їх властивостей не лише від хімічної та фізичної структури, але й від розміру часточок. Завдяки малому розміру нанорозмірні матеріали мають більше поверхнево-об'ємне співвідношення, яке забезпечує більшу реакційну здатність поверхні і надає їм чисельні унікальні властивості. Наночастинки можуть бути синтезовані, застосовуючи хімічний, фізичний та біологічний підходів [21, 22] та

використанням різних стабілізуючих агентів [23], що також певним чином впливає на їх функціональні характеристики.

Наноматеріали мають застосування у різних галузях – розпочинаючи від каталізу, фотоніки, молекулярних обчислень, накопичення енергії, паливних елементів, регульованих резонансних пристроїв до біомедичних застосувань [24]. Найважливіші повідомлення про спроби практичного використання наночастинок у медицині – для транспортування лікарських засобів, біосенсори, візуалізації та антибактеріальної терапії [25]. Однак, одним з підґрунтям для успішного застосування НЧ в медичній практиці є робота з стабілізованими, неагломерованими наноматеріалами, що дозволяє ефективно контролювати дозування, та їх біосумісність [26].

Все більше науковців приділяє увагу дослідженню нових матеріалів на основі наночастинок у якості потенційних антимікробних хіміопрепаратів [27]. Завдяки їх антимікробним властивостям та здатності ефективно запобігати стійкості до мікробних препаратів наночастинок оцінюються як альтернатива антибіотикам. Неорганічні сполуки, наприклад метали та їх оксиди (Fe_2O_3 , CuO , TiO_2 , MgO , Ag , Cu , ZnO тощо), є переважаючою групою, яка використовується для біомедичних та біотехнологічних застосувань [28]. Існує ряд публікацій, щодо результатів використання металевих наночастинок з антимікробними та противірусними властивостями для покращення засобів захисту від мікробних та вірусних інфекцій [29]. Фізико-хімічні особливості НЧ надають їм певних переваг у впливі на мікроорганізми та дозволяють успішно долати хоча б один із поширених механізмів опору [30]. Основними особливостями дії наночастинок при надходженні в організм еукаріотів є їх низька токсичність, тривала дія, здатність біотичних доз надавати стимулюючу дію на обмінні процеси, активність ферментів, ріст і розвиток організму в цілому [31].

Існує кілька способів застосування протимікробних властивостей НЧ у медицині. Надання антимікробних властивостей покриттю для імплантаційних пристроїв, кісткового цементу, стоматологічних та

перев'язувальних матеріалів здійснюється за рахунок додавання НЧ [32]. Доведено, що НЧ, як доповнення до покриття імплантаційних пристроїв, пригнічують адгезію та розмноження мікроорганізмів, а також запобігають появі запального процесу в зоні імплантації [33]. Низка наукових робіт висвітлює спроби застосувати НЧ під час лікування ран [34].

Серед широкого різномаяття неорганічних наночастинок, про які повідомляється в літературі, наночастинки срібла здаються найбільш перспективними завдяки їх ефективності та широкому використанню в різних галузях [35]. Хоча антибактеріальні властивості срібла відомі більше двох тисячоліть, його активне застосування із появою антибіотиків було призупинене. Із початком розвитку нанотехнологій цікавість до антибактеріальних властивостей срібла відновилаь. Завдяки тому, що висока питома поверхня наносрібласприяє хорошому контакту молекул металу з бактеріями та значному гальмуванню їх росту, прискореному загоєнню ран, НЧ срібла є більш ефективними у порівнянні з іншими його формами.

Контрольований синтез наночастинок є дуже важливим, оскільки антибактеріальна активність НЧ може знижуватися після модифікації їх поверхні [36]. Відомо, що на вихідні параметри НЧ впливає спосіб їх отримання. Згідно з [37] НЧ срібла, які було отримано із використання полівініл піролідону (ПВП), є більш стійкими, менш токсичними, а також мають кращу антимікробну активність, ніж НЧ срібла синтезовані із використанням інших стабілізуючих агентів. Вважають, що хімічний метод дає можливість отримати більше продукту порівняно з фізичним, що робить його більш популярним. Однак він є дорого вартісним [38], та не запобігає виникненню побічних ефектів у біологічних об'єктах [39]. Багато робіт присвячено дослідженню зеленого синтезу через його дешевизну та екологічність. Іншою істотною перевагою зеленого синтезу вважається гарна відтворюваність та стабільність синтезованих наночастинок [40].

Для з'ясування ефективності та механізмів антибактеріальної дії наночастинок металів та їх оксидів було проведено низку досліджень [41,

42], однак існуюча література все ще є суперечливою та неповною, а тому вивчення цих питань є на часі. Серед інших металевих наночастинок антибактеріальний механізм дії НЧ срібла вивчений найкраще. Розглядається два ймовірні механізми дії НЧ срібла – шляхом контактної кілінгу та іонно-опосередковане руйнування бактерій. Означені механізми на рівні клітини призводять до порушення проникності бактеріальної мембрани, індукції реакцій окиснювального стресу, пригнічення синтезу білку та нуклеїнових кислот [43].

НЧ Си також широко застосовуються у різних галузях та розглядаються, як багатообіцяюча альтернатива для препаратів із антибактеріальними властивостями. Більше того, мідь є життєво важливим хімічним елементом, який стимулює обмінні процеси, впливає на активність ферментів та ріст організму, і входить до складу низки біологічно-активних сполук. Зазначається, що наночастинок міді демонстрували антибактеріальну активність, як проти грампозитивних, так і проти грамнегативних мікроорганізмів (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. flexneri*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*). Більшу активність НЧ відносно грамнегативних мікроорганізмів пов'язують із відносно більшим негативним зарядом клітинної стінки у них [44]. Деякі дослідження повідомили про механізм бактерицидної активності НЧ Си, які полягають в тому, що іони Си, що вивільняються з НЧ, можуть взаємодіяти з фосфором і сірковмісними біомолекулами, такими як ДНК і білок, та змінювати їхні структури і тим самим порушувати внутрішньоклітинні біохімічні процеси [45].

Оксид цинку є джерелом з високим потенціалом для виробництва інноваційних мікро- та наноструктур для різноманітного застосування у зв'язку з такими його властивостями як: низька вартість, відносний надлишок матеріалу, хімічна стабільність, легкість у отриманні та відсутність токсичності [46]. Окрім цього, наночастинок ZnO індукують загоєння ран, запобігають запаленню та свербінню [47]. Наночастинок ZnO демонструють антибактеріальну активність щодо більшості патогенних та непатогенних

штамів. Більше того, включення Zn у матеріал для імплантатів сприяє проліферації та диференціації клітин остеобластів, що призводить до посилення остеогенезу [48]. Для зменшення частоти бактеріальних ускладнень у пацієнтів з травмами, отримано матеріал на основі гідроксиапатиту з антибактеріальними властивостями, шляхом додавання наночастинок ZnO та досліджено його активність щодо грампозитивних та грамнегативних бактерій.

Серед усіх різноманітних форм, саме тетраподи оксиду цинку нещодавно привернули широку увагу внаслідок унікальної форми та структури, виключних оптичних якостей порівняно з іншими формами [49]. Тетрапод оксиду цинку складається з ядра оксиду цинку, від якого чотири відгалуження в однаковій мірі тягнуться до навколишнього простору, що забезпечує їх властивістю збирати гарну сітку з бажаною пористістю та механічною стійкістю, поєднуючи відгалуження один з одним [50]. Сьогодні тетраподи оксиду цинку широко застосовують у фізиці, хімії, електронній інженерії, матеріальній науці, енергетичній, текстильній, гумовій та адитивній промисловості, косметичі, фармацевтиці та медицині [51]. Унікальна форма тетраподів дозволяє створювати внутрішньозамикаючі сегменти, надає їм різноманітних функціональних властивостей у сфері самозаповнюючихся матеріалів [52], поверхонь, які не обростають, [53], агентів генної інженерії [54] та антивірусних матеріалів [55].

Є деякі суперечливі дані про протимікробну дію T-ZnO. Деякі дослідження повідомляють про вплив розміру та їх концентрації на антибактеріальну активність [56]. Іншими факторами, які впливають на антимікробну активність, є наявність поверхневих дефектів [57], реактогенність та тип стабілізуючої речовини, що додається під час виготовлення частинок ZnO [58]. Існує припущення, що продукція H_2O_2 є одним із основних антибактеріальних механізмів наночасточок ZnO [59]. В іншому випадку, нанорозмір T-ZnO має кращі антибактеріальні властивості завдяки великій міжповерхневій площі [60] та властивість пошкоджувати

клітинну стінку через локальну взаємодію ZnO та посилену проникність мембрани [59]. Niu L. N. повідомляє, що тетраподи-ZnO мають подібну антибактеріальну дію до наночастинок металу з меншою кількістю МІС, порівняно зі сферичними мікрочастинками ZnO за рахунок поверхні тетраподоподібних структур, що є набагато ефективнішою [61].

Пошук способів підвищення антибактеріальної активності та зниження токсичності наночасточок металів поводить за різними напрямками. Один із них базується на комбінуванні різних металів або їх оксидів (найбільше нанорозмірного рівня) в одному розчині, в сумішах або ж створення хелатованих форм металів [62]. Є багато даних про вивчення антибактеріального ефекту комбінацій різних металів: чистого цинку з залізом та магнієм [54], оксиду цинку зі сріблом [58], золотом [63] та міддю [64].

Отримані дані вказують на зростання антибактеріальної активності наночасточок у разі їх поєднання відносно грампозитивних та грамнегативних мікроорганізмів (*E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *M. tuberculosis*, *K. pneumoniae*, *S. typhi*, *P. aeruginosa*)[65]. Запропоновано різні гіпотези для пояснення механізму взаємного підсилення наночасточок при поєднанні різних металів, а саме:

- 1) зміна фізичних характеристик часточок (структури, поверхні, розміру.
- 2) Взаємодоповнююча та підсилююча дія наночасточок на структури бактеріальної клітини.

Не зважаючи на значну кількість досліджень, які було проведено, механізм дії металевих наночасточок залишається дискутабельним і значною мірою це стосується особливостей їх синергічної дії.

Іншим способом підвищення ефективності НЧ металів при одночасному зниженні активних концентрацій і, як наслідок, зниженні потенційного токсичного впливу, є дослідження їх властивостей за умов залучення додаткових етапів обробки різними фізичними факторами. Чисельні

дослідження свідчать про підсилення ефекту антибіотиків при їх поєднаному застосуванні з ультразвуком [66]. Najer Rokbani зазначив, що ультразвукова обробка може підсилювати антибактеріальний ефект наночастинок оксиду цинку відносно *E. coli* за рахунок дисоціації часточок та підсилення їх пенетраційної здатності [67]. Однак дуже незначна кількість досліджень висвітлює вплив ультразвуку на антимікробну активність наночастинок міді та срібла, як поодиночі так і під час їх поєднання.

Включення або розчинення мікро- та наночастинок з різними полімерами може також стабілізувати структуру нанометалів, запобігаючи їх спонтанній агрегації, та підвищити антибактеріальну активність. Природні полімери та їх похідні, такі як желатин, хітозан, альгінат натрію, а також синтетичні полімери, включаючи полівініловий спирт та полівініл піролідон використовуються для підвищення стійкості, дисперсності та активності нано- та мікрочастинок оксидів металів [68]. Наприклад, гібридні матриці з деяких полімерів можуть знижувати ефективну антимікробну концентрацію наночастинок тетраподів-ZnO [69].

Хітозан є найбільш часто вживаним полімером через його нетоксичність, додатковий антибактеріальний вплив та здатність стимулювати регенераторні процеси [70]. Цей природний полімер отримують із хітину в процесі деацетилювання. Він складається із двох типів мономерів *N*-ацетиламіноглюкозаіаміноглюкоза. У деяких роботах відображається, що композити хітозан-ZnO, у деякій концентраціях, посилюють антибактеріальний ефект [71], але відсутня інформація про композити та розчини з ZnO як у нано-, так і у мікророзмірах. Завдяки наявності вільних аміногруп, хітозан має власну виражену протимікробну активність [72]. Хоча цей полімер схильний до біодеградації [73, 74], однак, у чистому вигляді він має досить низьку міцність і низьку стійкість у водних середовищах [75]. Унікальною особливістю біополімеру є його кровоспинна [76] та антиоксидантна активність [77]. Унаслідок своєї полі (катионної) природи хітозан має мукоадгезивні властивості і може взаємодіяти з сіаловою

кислотою, присутнім у слизу [78]. Наявність позитивно заряджених вільних аміногруп надає йому аналгетичної активності. Крім того біополімер може призвести до збільшення проникності клітинної мембрани [79]. І, нарешті, хітозан має кровоспинні властивості завдяки утворенню згортків під час його взаємодії з негативно зарядженими тромбоцитами і еритроцитами [80]. Хітозан широко застосовується у медицині, а виготовлення біологічно-сумісних перев'язувальних матеріалів (гранул, губок, перев'язок) є одним із перспективних напрямків його застосування [81].

Враховуючи усе вище перелічене пошук найбільш ефективних способів синтезу наночасточок, детальне вивчення механізмів їх впливу та комбінування з іншими хімічними сполуками та фізичними факторами є актуальними питаннями сьогодення.

2 ОБ'ЄКТИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Матеріали

Нітрат срібла (AgNO_3) (домішка > 99,9%, рік), полівінілпіролідон (PVP - K25, МВт 24000), етиленгліколь (ЕГ) (домішка > 99,9%), моногідрат гіпофосфіту натрію ($\text{NaH}_2\text{PO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$), мідь в якості сировини, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, етиленгліколь, сульфатний пентагідрат ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), ізопропіловий спирт (99% чистоти) були отримані від Sigma-Aldrich. Дистильована вода з електричного дистилятора DE 20 використовувалася протягом усіх експериментів. Поживний бульйон і поживний агар були придбані у компанії Hi Media India.

2.2 Синтез наночастинок срібла

Під час дослідження нами було використано наночастинки синтезовані двома різними способами.

Синтез наночастинок Ag методом хімічного відновлення, із використанням підходів, що застосовуються у так званій «зеленій хімії» проводили із використанням екстракту імбиру (*Zingiber officinale*) або екстракту росянки (*Drosera* spp.) у якості поверхнево-активної речовини. Спочатку готували етанольний рослинний екстракт, а потім додавали його до нітрату срібла. Свіжосинтезовані НЧ срібла промивали водою, поки рН досягала 7, наприкінці використовували центрифугування (4000 об / хв., 30 хв).

Класичний метод отримання наночастинок срібла передбачав розчинення 6,8 г PVP в 40 мл етиленгліколю з подальшим нагріванням до 160°C на масляній бані з постійною магнітною мішалкою. Потім 0,68 г AgNO_3 розчиняли в 40 мл етиленгліколю і додавали по краплях у зазначений вище розчин зі швидкістю 5 мл хв. Реакції давали протікати протягом 2 год

при температурі 160 °С. Утворення коричневої колоїдної дисперсії свідчило про утворення наночастинок срібла. Колоїдну дисперсію охолоджували і змішували з ізопропіловим спиртом, кількість якого в 4 рази перевищувала суміш наночастинок. Осад збирали після центрифугування (10000 об / хв протягом 30 хв) і промивали ізопропіловим спиртом три рази з подальшим висушуванням при 50 °С протягом 2 год у вакуумній сушарці. Наночастинки обробляли низькочастотним ультразвуком ($22 \pm 1,65$ кГц) протягом 1 хвилини.

2.3 Синтез наночастинок міді

Синтез наночастинок міді також проводили із застосуванням двох різних підходів – «зеленої хімії» та із використанням полівінілпіролідону у якості поверхнево-активної речовини.

11,0 г ПВП і 4,0 г гіпофосфіту натрію розчиняли в 40 мл дистильованої води, перемішували за допомогою магнітної мішалки до повного розчинення при кімнатній температурі. Розчин нагрівали до 85 °С зі швидкістю 5 об/хв⁻¹. Потім 2,5 г сульфату міді аналогічно розчиняли в 10 мл дистильованої води і повільно додавали до розчину гіпофосфіту ПВП / натрію при постійному перемішуванні. Поступово колір суспензії ставав коричневим, що свідчило про утворення мідних наночастинок. Загалом реакція тривала 15 хв. Дисперсію охолоджували до кімнатної температури і змішували з певною кількістю дистильованої води. Осад збирали після центрифугування (8000 об / хв протягом 10 хв) і промивали ізопропіловим спиртом три рази з метою видалення надлишку ПВП і побічних продуктів з подальшим сушінням при 50 °С протягом 2 год у вакуумній сушарці. Наночастинки обробляли низькочастотним ультразвуком ($22 \pm 1,65$ кГц) протягом 1 хвилини (ультразвуковий диспергатор UZDN-A (SELMІ, Україна).

НЧ Cu синтезували методом хімічного відновлення із використанням імбиру (*Zingiber officinale*) та L-аскорбінової кислоти. Для приготування

екстракту кореневища імбиру, 250 г кореневища зберігали у водно-етанольному розчині (250 мл, співвідношення 1: 1, 5 днів. Ацетат міді (II)(1000 мг) розчиняли у воді (150 мл). L-аскорбінову кислоту (10%, 10 мл) та екстракт імбиру (15 мл) додавали по краплі до розчину ацетату міді (II) і нагрівали (75 ° C, 1 год).

2.4 Синтез наночастинок ZnO

Тетраподальні мікрочастинки ZnO були отримані синтезом транспорту полум'я (FTS) в університеті Кіля. Частинки отримували з порошку цинку (розмір зерна 1–10 мкм), змішаного з порошком полівініл-бутиралу в якості полімерної матриці (масове співвідношення 1:2). Цю суміш нагрівали протягом 30 хв до 900 °C всередині муфельної печі зі швидкістю нагрівання 60 °C хв⁻¹. Згодом типові тетраподи ZnO самозбиралися із пухкого порошку.

Синтез сферичних наночастинок ZnO проводився шляхом класичного синтезу із застосування поліолу. Етиленгліколь використовували, як реакційне середовище. Спочатку 2,19 г Zn (CH₃COO)₂ • 2H₂O та 10 мл етиленгліколю (ЕГ) поміщали в двошийкову колбу об'ємом 50 мл із зворотним конденсатором у центральній горловині та термopарою, з'єднаною з терморегулятором нагрівання колби правої горловини. Отриману суміш нагрівали в колбі нагрівачем із перемішуванням (3000 об / хв) за допомогою тефлонового змішувача. Суміш витримували 60 хвилин при 160 °C. Під час синтезу в результаті реакції розкладання було отримано наноструктурований ZnO. $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O \rightarrow ZnO + 2CH_3COOH + H_2O$, потім суміш охолоджували до кімнатної температури і отриманий продукт відокремлювали шляхом центрифугування від органічної сполуки. Решту ЕГ промивали етанолом при інтенсивному перемішуванні з наступним центрифугуванням. Відмиті зразки ZnO сушили протягом 24 годин при 60 °C. Схематично цей процес показано нарис. 2.1

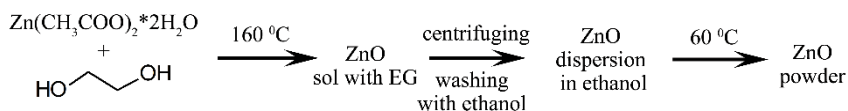


Рисунок 2.1– Схема синтезу наночастинок ZnO

Синтез паличкоподібних наночастинок ZnO (ZnO-НЧ) проводили із використанням газоподібної дисперсії (ГДС). Метод передбачає створення спеціально організованих двофазних полум'я-пилових хмар відповідних металів (чисті метали, механічні суміші або сплави різних металів). Кінцевий продукт отримують у результаті конденсації газоподібних продуктів горіння металів окислювальній атмосфері. Для подальшого використання ZnO-НЧ, були дисперговані в 99,8% розчині бутанолу в концентрації (10 мг / мл) і потім обробляли ультразвуком (частота 44 кГц) протягом 30 хв. У подальшому розчин ZnO-НЧ (20 мкл) осаджували на очищену скляну підкладку для того, щоб на склі утворився поверхневий шар ZnO-NRs. Зразки сушили при кімнатній температурі та відпалювали в муфельній пічі при температурі 450 °C на повітрі протягом 3 год.

2.5 Синтез наночастинок гідроксиапатиту

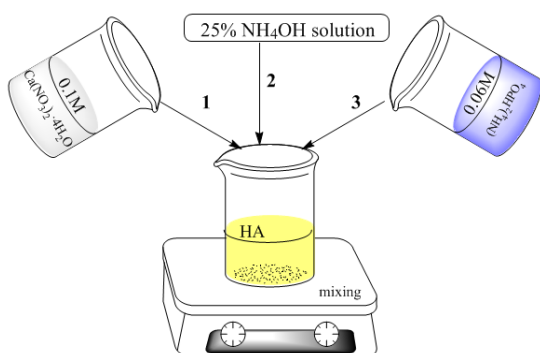
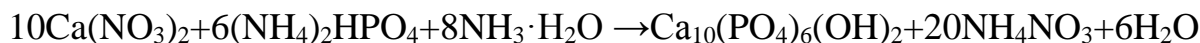


Рисунок 2.2 –Схема синтезу гідроксиапатиту

Спочатку 23,6 г $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ розчиняли у 500 мл дистильованої води для отримання 0,1 М розчину. 7,92 г $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ розчиняли у 500 мл дистильованої води та отримували 0,06 М розчин. $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ - стехіометричний ГА синтезували за такою схемою:



Аналізовані солі $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ та $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ були взяті в концентраціях 0,1 М та 0,06 М відповідно. Спочатку розчин 0,1 М $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ змішували з розчином аміаку, після чого до вищезазначеного розчину по краплях додавали 0,06 М $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ розчин (рис 2.2). рН розчину доводили до 10, додаючи 25% розчин аміаку. Після витримки протягом двох днів його промивали дистильованою водою до рН = 7. Для отримання композитного матеріалу його використовували як суспензію. Наночастинки гідроксиапатиту та ZnO із середнім розміром 80 та 10-30 нм відповідно змішували у вигляді суспензії у пропорції 5:1 по масі, отриманий композитний матеріал центрифугували при 2500 об / хв.

2.6 Синтез та характеристика хітозану

Під час дослідження використовували два типи хітозану – гель та аерогель. Усі аерогелі хітозану були отримані в умовах мікрохвильової печі, використовуючи побутову мікрохвильову піч відповідно до принципів зеленої хімії. Для синтезу 0,5 г хітозану з 90% або 95% ступеня деацетилювання (DD) розчиняли у водному розчині амінокислоти: L-аспарагінової, L-глутамінової або їх суміші (табл. 2.1). Через 30 хв додавали 10 мл пропіленгліколю. Готовий гомогенний розчин поміщали в реакційну посудину і піддавали мікрохвильовому випромінюванню протягом 1 хв до повного випаровування води (потужність = 900 Вт).

Потім реакцію зшивання проводили протягом 2 хв (потужність = 900 Вт), де пропіленгліколь виконував роль розчинника. Отримані гідрогелі насичували дистильованою водою і доводили кислотність до рН = 7. Після цього гідрогелі ліофілізували і трансформували в аерогелі.

Аналіз інфрачервоної спектроскопії Фур'є (FTIR) проводили за допомогою ІЧ-термомеханічного спектру Ніколет Нексус X 470 (алмазний

кристал ATR), США. Діапазон був від 400 до 4000 cm^{-1} з 32 сканування і 4 cm^{-1} дозволу.

Таблиця 2.1 – Склад аерогелів хітозану

	Зшиваючі агенти		Ступінь деацетилювання хітозану(DD)
	L –аспарагіновий (Asp)	L –глутамічний (Glu)	
95Ch-Asp	0,84 р	-	95%
90Ч-глю	-	0,84 р	90%
95Ч-глю	-	0,84 р	95%
95Ch-1Asp: 5Glu	0,74 гр	0,22 гр	95%
90Ch-1Asp: 1Glu	0,50 гр	0,50 гр	90%
95Ch-1Asp: 1Glu	0,50 гр	0,50 гр	95%
95Ch-2Asp: 1Glu	0,70 гр	0,30 гр	95%
95Ch-5Asp: 1Glu	0,17 р	0,84 р	95%

Дослідження пористості та щільності отриманих хітозанових матеріалів визначали за рахунок переміщення ізопропанолу, оскільки він не змочує зразок. Досліджувані біоматеріали розміщували у раніше виміряний об'єм ізопропанолу. Після фіксованого часу (5 хв) вимірювали зміни обсягу спирту поглинутого аерогелем. Потім вивчений хітозановий каркас був видалений з ізопропанолу. На останньому етапі, вимірювали різницю в обсязі ізопропанолу. На основі отриманих даних, щільності (рівняння (1)) і пористість (рівняння (2)) були розраховані з використанням наступних рівнянь:

$$d = W / (V_2 - V_3) \quad (1)$$

$$p = (V_1 - V_3) / (V_2 - V_3) \cdot 100\% \quad (2)$$

де d - щільність, $\text{г} / \text{см}^3$

p - пористість, %

W - маса досліджуваного зразка, г

V_1 - початковий обсяг ізопропанолу, см^3

V_2 - об'єм ізопропанолу з зануреним зразком, см^3

V_3 - обсяг ізопропанолу після видалення зразка, см^3

Для того, щоб визначити швидкість пропускання водяної пари (ШПВП) зразки фіксували на отвір (область 1 см²) полістиролу за допомогою полімерного клею. Кожна посудина містила 5 мл дистильованої води. Дослідження проводили протягом 24 годин при 37 °С. ШПВП вимірювали, виходячи з кількості втрат води. Швидкість пропускання водяної пари розраховували за допомогою наступного рівняння:

$$WVTR = (W_t - W_0) / (tA) \text{ (g m}^{-2} \text{ *d}^{-1}\text{)} \quad (3)$$

де:

W_0 - початкова вага,

W_t - вага після часу t ,

t - час вимірювання

A - площа отвору

Антиоксидантні властивості підготовлених каркасів хітозану досліджували стандартним методом ДФПГ. З цією метою розчином ДФПГ в метанолі готували таким чином, що оптична щільність розчину становила 1,0 при 517 нм з використанням Aligent 8453 спектрофотометру. Для визначення здатності викидання вільних радикалів по 0,10 г кожного зразка поміщали в 5 мл розчину ДФПГ (25 мг / л) і залишали в темряві на 1 год при постійному струшуванні. Потім вимірювали поглинання кожного розчину при 517 нм. Відсоток вилучених вільних радикалів розраховували за допомогою рівняння (4):

$$\% S = (A_s - A_c) / A_c \quad (4)$$

де:

$\% S$ - $\%$ вільних радикалів, які були нейтралізовані

A_c - поглинання розчину ДФПГ без зразка

A_s - коефіцієнт поглинання ДФПГ розчину, що містить в зразок

Дослідження деградації гемостатичного хітозану проводили в імітаційній рідині тіла (СБФ). Попередньо біоматеріали стерилізували автоклавуванням. Дослідження проводилися протягом семи днів. Для цього, зважують зразки хітозану, потім занурюють в 50 мл стерильного розчину

СБФ. Аерогелі виймали, промивали дистильованою водою з наступним висушуванням і зважуванням через визначені проміжки часу.

Дослідження біодеградації *in vitro* було проведено за допомогою лізоциму людини - ферменту, який природним чином виникає в організмі людини у сльозах та сироватці крові в концентрації 7–13 мг/л. Лізоцим – це фермент, гідролізуючий β -глікозидні зв'язки. Для дослідження зважували аерогелі хітозану, потім занурювали у чистий СБФ та СБФ, що містить лізоцим (концентрація = 10 мг / л при 37 °С) для імітації природних умов. Зразки виймали, промивали дистильованою водою, сушили і зважували через визначені проміжки часу. Відсоток деградації та біодеградації розраховували за допомогою наступного рівняння:

$$(B) D = (W_0 - W_t) / W_0 \cdot 100\% \quad (5)$$

де:

(B) D - ступінь деградації (біо) ,%

W_0 -поаяткова вага аналізованого зразка, г

W_t —вага зразка після часу = t, хв

Дослідження будови губок проводили із застосуванням скануючої електронної мікроскопії (СЕМ). Губки видаляли з крові, поміщали в 2% глутаральдегід на 2 години, потім зневоднені зразки поміщали в етанол і сушили. Щоб уникнути накопичення поверхневого заряду в електронному зонді, зразки покривали тонким (30–50 нм) шаром срібла у вакуумній установці VUP-5M (SELMI, Суми, Україна). СЕМ-зображення губок спостерігали за допомогою FEI Inspect S50B (FEI, Брно, Чеська Республіка) за допомогою вторинного електронного детектора Everhart – Thornley.

2.7 Функціоналізація ZnO-NR білками та оцінка імуносенсорної відповіді

Для функціоналізації ZnO-НЧ білками та оцінки імуносенсорної відповіді BLV білки gp51, які служили антигеном (Ag) для анти-

gp51антитіла, були використані при розробці частини біологічного розпізнавання імуносенсору. Білки BLV іммобілізували на ZnO-НЧ модифікованій скляній (ZnO-НЧ/скло) поверхні. Скельця з ZnO-НЧ промивали етанолом, сушили і потім промивали фізіологічним (0,85%) розчином NaCl. Початковий білок BLVgp51, який діяв як антиген (Ag) у цій біоаналітичній системі, містив зразок, розведений до концентрації 0,5 мг / л у розчині NaCl і такі розведені розчини інкубували на поверхні ZnO-НЧ нанесених на скляних підкладках протягом 20 хв для того, щоб отримати шар gp51/ZnO-НЧ/скло. Тоді gp51/ZnO-НЧ/скло промивали фізіологічним розчином NaCl і сушили на повітрі при кімнатній температурі. Щоб запобігти неспецифічній адсорбції білків, gp51/ZnO-НЧ/скло інкубували в 0,5 мг/мл розчину BSA протягом 20 хв (рис. 2.3). Фотолюмінісцентні спектри були зареєстровані до і після кожного етапу інкубації.

Для отримання модифікованих поліамід гідрохлоридом (ПАГ) поверхонь ZnO-НЧ/скло інкубували водний розчин ZnO/скло з 20 мкг/мл ПАГ 20 хв на поверхні ZnO-НЧ/скло і потім її промивали дистильованою водою і сушили на повітрі при кімнатній температурі. Потім проводили іммобілізацію gp51 та BSA на склі ПАГ/ZnO-НЧ аналогічно процедурі, яка описана для ZnO-НЧ/скло і таким чином на gp51+BSA/ПАГ/ZnO-НЧ/скло формувалася імуносенсорна структура. Фіксували ФЛ-спектри до та після кожного кроку модифікації.

Під час визначення антитіл проти білків BLVgp51 (gp51), зразки gp/51ZnO-НЧ/скло та gp51/ПАГ/ZnO-НЧ/скло інкубували протягом 20 хв у сироватці великої рогатої худоби, що містить "BLV-позитивний anti-gp51 та аліквотну сироватку великої рогатої худоби, що не містить анти-gp51. Перед інкубацією як "BLV-позитивні", так і "BLV-негативні" скло (А) і на - ПАГ / ZnO-НЧ / скло (В).

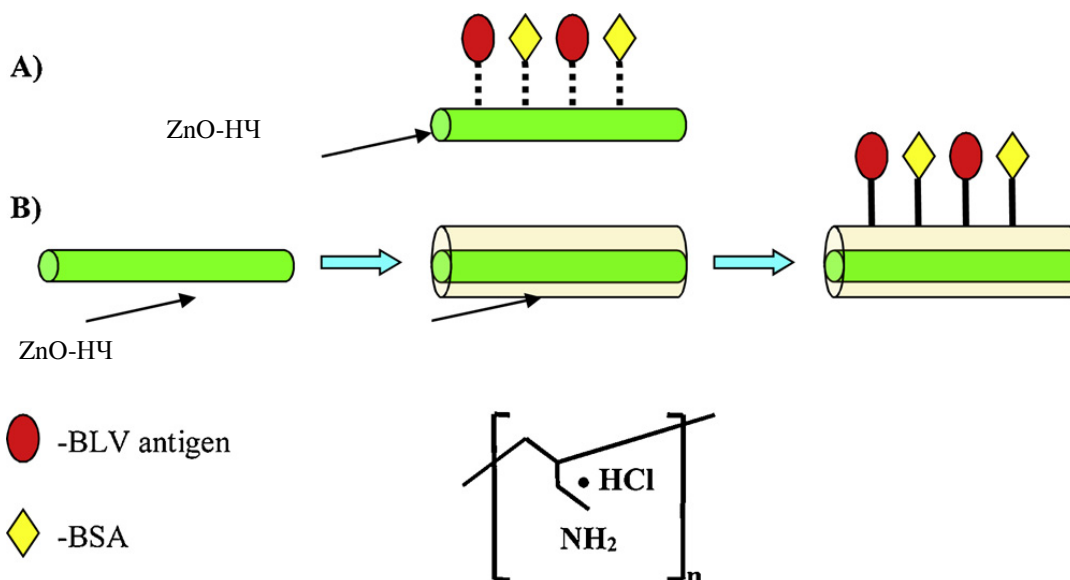


Рисунок 2.3 - Схема іммобілізації BSA та білка gp51 на поверхні ZnO-NH₂

2.8 Фізико-хімічна характеристика отриманих зразків

Скануюча електронна мікроскопія (SEM) зразків проводилася з використанням Hitachi S 4800 (Офіс Мангейма) (Японія). Флюоресцентні спектри вивчали за допомогою оптичного волоконного спектрометра, HR 2000 + від Ocean Optics (Данедін, США) у діапазоні довжин хвиль 360 - 420 нм. Рамановий спектрометр ALFA 300 R від Witek (Ульм, Німеччина) із лазерним джерелом збудження 532 нм було використано для пропускання Рамана вимірювання. Раманові спектри зразків реєстрували в діапазон $50\text{--}2000\text{ см}^{-1}$. Аналіз синтезованих порошків ГА та фазових наночастинок ZnO проводили за допомогою рентгенівського порошкового дифрактометра (DRON-3M, Росія). Дифрактометр був обладнаний нітрометром 0,154 нм. Дифрактограми вимірювались за допомогою випромінювання $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,5418\text{ \AA}$), що генерується при напрузі 40 кВ та струмі 40 мА. Зразки сканували в інтервалі $20^\circ < \theta < 50^\circ$ зі швидкістю сканування $20^\circ / \text{хв}$, розміром кроку $0,05^\circ$ в безперервному режимі. Аналіз рентгенівських зразків був проведений за референтними даними дифракції

порошку, наданими Об'єднаним комітетом з питань стандартів дифракції порошку. Мікроструктурне дослідження було здійснене на трансмісійному електронному мікроскопі (TEM-125K) (SELMІ, Україна) та скануючому електронному мікроскопі SEO-SEMIn-спектр S50-B (компанія FEI, Hillsboro, OR, США). Електрони з джерел 5 кВ використовувались для формування відповідної інформації про зразки.

2.9 Обробка наночастинок ультразвуковими хвилями

Джерелом ультразвукових коливань для обробки розчинів НЧ металів слугував ультразвуковий диспергатор УЗДН-А з робочою частотою $22 \pm 1,65$ кГц та тривалістю 2 хв.

2.10 Оцінка антибактеріальної активності наночастинок Ag, Cu, ZnO та їх композитів проти полірезистентних штамів ESKAPE.

Для мікробіологічних досліджень використовувались клінічні та референтні штами *Enterococcus faecium*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter spp.* та *E.coli*. Ізоляти культивували протягом ночі в живильному бульйоні при 37 °С. Культури розбавляли живильним середовищем до клітинної концентрації, еквівалентної 10^5 КУО/мл. Вивчення протимікробної активності НЧ проводили із застосуванням методу серійних розведень із визначенням мінімальної інгібуючої концентрації (МІК) відповідно до міжнародних рекомендацій, наданих Клініко-лабораторним інститутом стандартів. Пробірки, які містили лише поживне середовище та досліджувані речовини було використано у якості контролю. Всі пробірки інкубували при 37 °С протягом 24 годин. Мінімальна інгібуюча концентрація (МІК) визначалася, як найнижча концентрація, яка демонструвала відсутність видимого росту (середовище залишалось прозорим). Всі дослідження повторювали тричі.

Окремо досліджено антибактеріальну активність НЧ срібла, міді, цинку та їх поєданого застосування, після УЗ обробки та в комбінації з хітозаном.

Антибактеріальну активність хітозанових губок оцінювали щодо грампозитивних (*S.aureus*) та грамнегативних (*E.coli*) бактерій. Перед тестом губки нарізали невеликими шматочками (4 мг) і стерилізували під УФ-світлом. Культури бактерій інкубували протягом дня в поживному бульйоні. Далі культури розбавляли культивувальними середовищами до концентрації мікроорганізму, еквівалентної 10^4 колонієутворюючої одиниці (КУО)/мл ($4 \log_{10}$ КУО), яка використовувалася в якості інокуляту.

В асептичних умовах кожен зразок поміщали в пробірки з 2 мл мікробних інокулятів та інкубували протягом 2, 4, 6, 8, 10 та 24 год при 37°C . Пробірки, що містять середовище росту і випробувані зразки без інокулярів, використовували в якості контролю. Після цього 100 мкл суспензії з пробірки поміщали на чашу з твердим середовищем та інкубували при 37°C протягом 24 год. Життєздатні організми підраховувались у \log_{10} . Всі дослідження проводилися тричі.

2.11 Статистична обробка результатів

Статистичний аналіз проводили за допомогою ANOVA з декількома порівняннями (програмне забезпечення GraphPad Prism 8.0). Дані були виражені у вигляді середніх значень \pm стандартне відхилення. Т-тест Стьюдента для непарних даних був використаний для оцінки статистичної значущості різниці між результатами, отриманими від тестованих зразків. Статистичну значимість передбачали на рівні 95% ($p < 0,05$).

3 ХАРАКТЕРИСТИКА ОБ'ЄКТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

3.1 Характеристика НЧ Ag, Cu та ZnO, які було синтезовано

Результати рентген-структурного аналізу НЧ срібла синтезованих із використанням підходів «зеленої» хімії показали наявність чотирьох гострих піків при 38,15, 44,33, 64,48, 77,47 та 81,54 °2 Тета (рис. 3.1 а). Згідно з базою даних про структуру кристалів американських мінералогів (AMCSD) ці піки були розцінені як характерні для срібла. Спектр інфрачервоної спектроскопії НЧ срібла представлений на рис. 3.1 с. Як видно, на спектрі є дві слабкі смуги на рівні 1635 і 3425 cm^{-1} . Ці піки були віднесені до режиму коливання груп О-Н, які були присутні на поверхні частинок Ag. При проведенні трансмісивної електронної мікроскопії (ТЕМ) з'ясували, що НЧ Ag мають округлу форму та розміри 5-9 нм. Таким чином, результати рентген-структурного аналізу, ультрафіолетової віскозиметрії, ТЕМ та інфрачервоної спектроскопії підтвердили хімічний склад наночастинок, які було застосовано, а також їх високу чистоту та кристалічність.

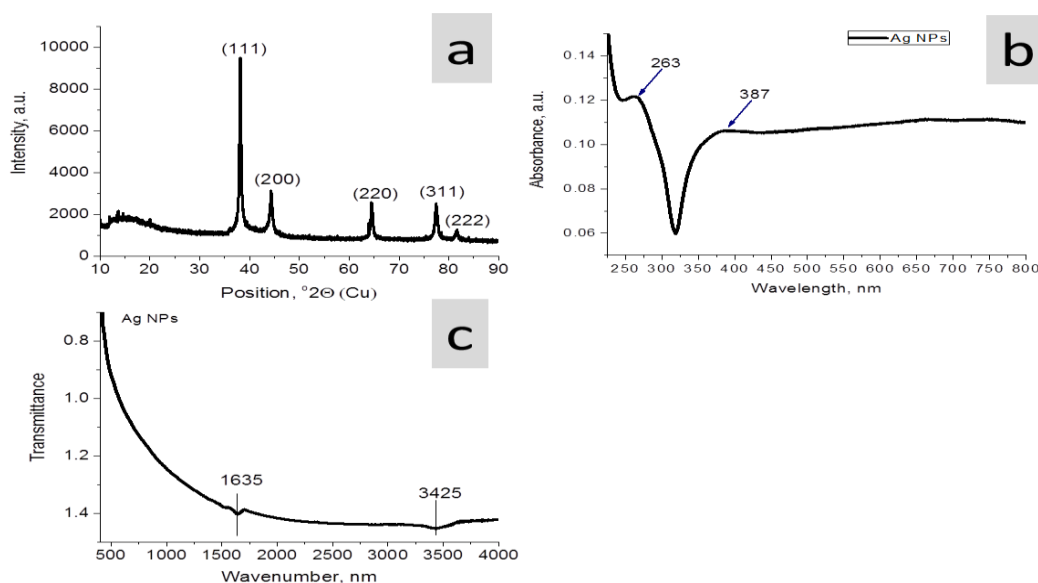


Рисунок 3.1 - Характеристика наночастинок срібла: (а) рентген-структурний аналіз, (б) ультрафіолетова віскозиметрія, (с) інфрачервона спектроскопія

Фізико-хімічні характеристики наночастинок срібла, синтезованих з використанням поліольного методу, відображені на рис. 3.2.

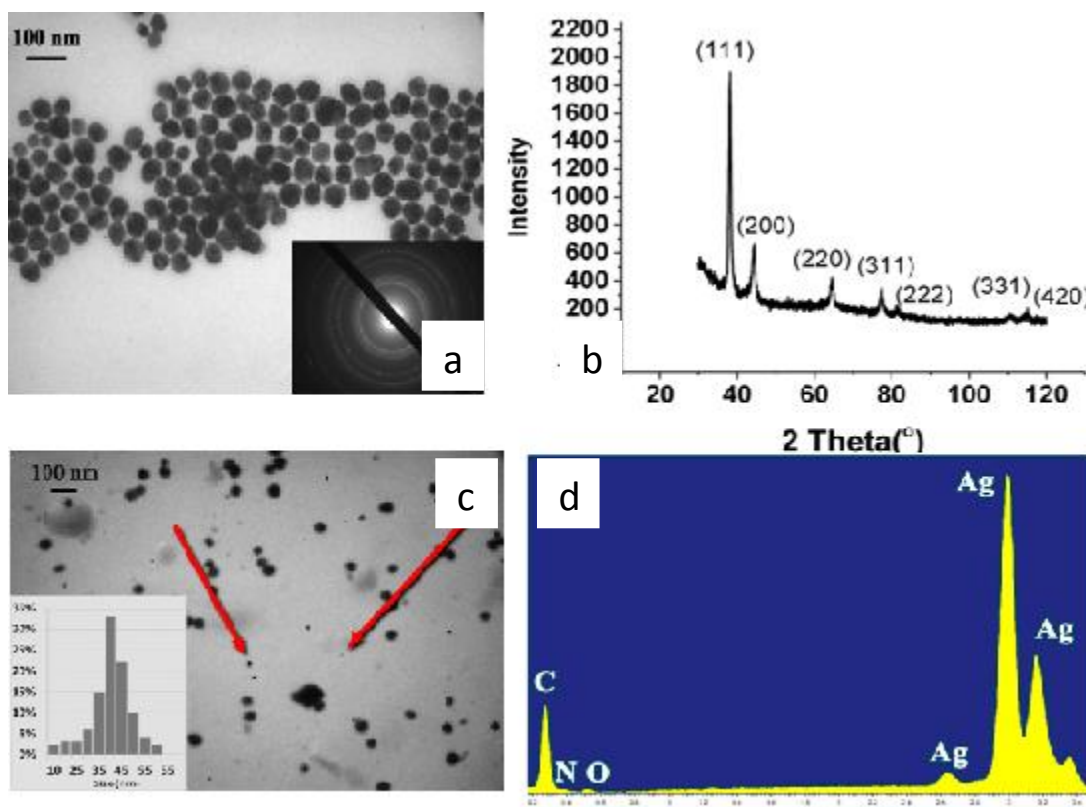


Рисунок 3.2 – Характеристика наночастинок срібла: (а) скануюча електронна мікроскопія, (b) інфрачервона спектроскопія, (c) трансмісійна електронна мікроскопія, (d) ультрафіолетова віскозиметрія

Як видно з SEM та TEM наночастинки срібла кулястої форми, із середнім діаметром 45 нм і розмір варіює в діапазоні 25-60 нм. Рентген структурний аналіз показує сім чітко виражених дифракційних піків при $38,15^\circ$, $44,32^\circ$, $64,55^\circ$, $77,52^\circ$, $81,55^\circ$, $110,47^\circ$ і $115,17^\circ$. Піки узгоджуються з даними на стандартній картці (файл JCPDS № 3-921), які відповідають планам з кубічним Ag-центром (111), (200), (220), (311), (222), (331) і (420). Обчислений параметр решітки $a = 0,408$ нм і одиничний об'єм комірки $V = 0,068 \times 10^{-27}$ м³. Не виявлено піків інших фаз, що вказує на високу чистоту отриманих Ag-NP. УФ-видимий спектр наночастинок срібла, диспергованих у воді виявив резонанс широкого поверхневого плазмону при 450 нм, що відповідає розподілу розмірів за рахунок часткової агрегації наночастинок

срібла. Наявність такого піку, приписується до поверхневого плазмонного резонансу наночастинок срібла.

Фізико-хімічні характеристики зразків міді, які були синтезовані із використанням підходів, які притаманні «зеленій» хімії, було відображено у попередньому річному звіті.

Фізико-хімічний аналіз наночастинок міді, отриманих поліольним методом, підтвердив їх хімічну тотожність міді. Оскільки, зразок Cu / Cu₂O показує характерний пік поглинання при $\lambda = 505$ нм, тим самим підтверджуючи утворення Cu₂O наночастинок. Пік поглинання обумовлений резонансним збудженням плазми атомів міді на поверхні наночастинок. Стандартні дані стверджують, що характерний пік поглинання для Cu₂O зазвичай спостерігається в околиці $\lambda = 490$ нм. Завдяки резонансному ефекту поверхневого плазмону Cu-NP зазвичай демонструють поглинання в діапазоні 500-600 нм, а Cu₂O-NP демонструють поглинання в діапазоні 300-500 нм.

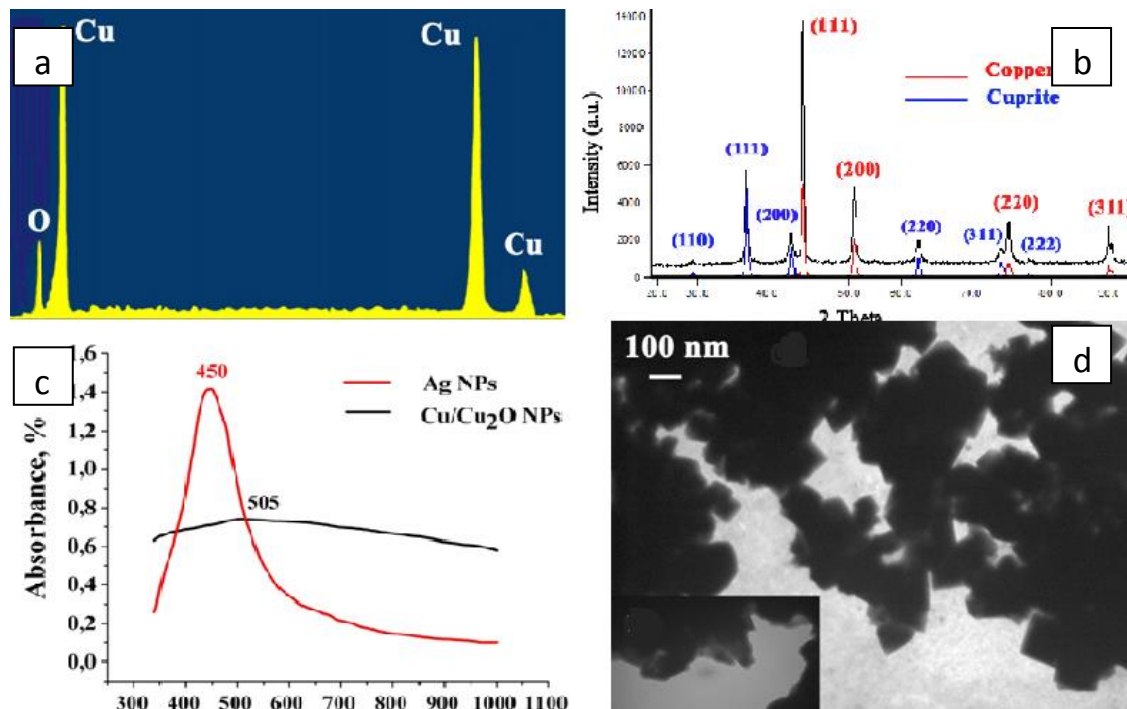


Рисунок 3.3 –Характеристика наночастинок міді, отриманих поліольним методом: (а) ультрафіолетова віскозиметрія, (б) рентген-структурний аналіз, (с) інфрачервона спектроскопія, (д) скануюча електронна мікроскопія.

ТЕМ-мікроскопія сферичних наночастинок ZnO показана на рис.3.4. Отримані наночастинки мають сферичну форму (рис. 3.4, а). Ми синтезували наночастинки розміром від 10 до 30 нм із середнім розміром 18 нм, а також частинки меншого розміру, які забезпечують більш високу питому площу поверхні та виявляли більш високі антибактеріальні властивості.

Рентгендифракційний аналіз отриманих поліольним методом наночастинок ZnO показав характерні дифракційні піки для синтезованих наночастинок ZnO (рис. 8) спостерігались у положенні $2\theta = 32,18^\circ$, $34,02^\circ$, $36,67^\circ$, $47,95^\circ$ відповідно до (100), (002), (101) та (102) кристалічних площин відповідно. Вони збігаються з карткою JCPDS №. 01-089-1397. Присутність їх також доводиться дифракцією електронів.

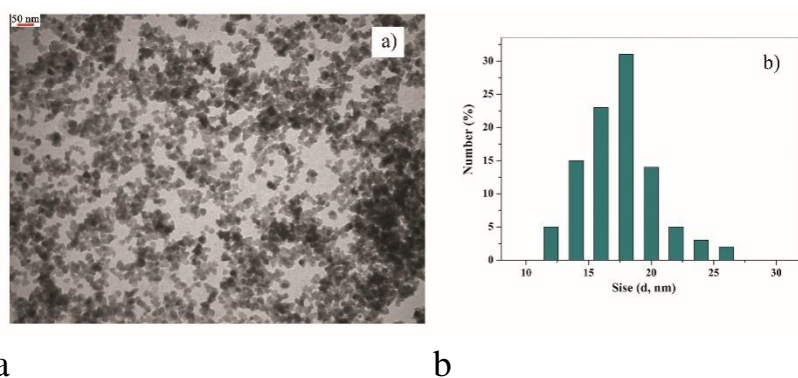


Рисунок 3.4 -Зображення трансмісійної електронної мікроскопії (ТЕМ) наночастинок ZnO (а) та середній розмір частинок (б)

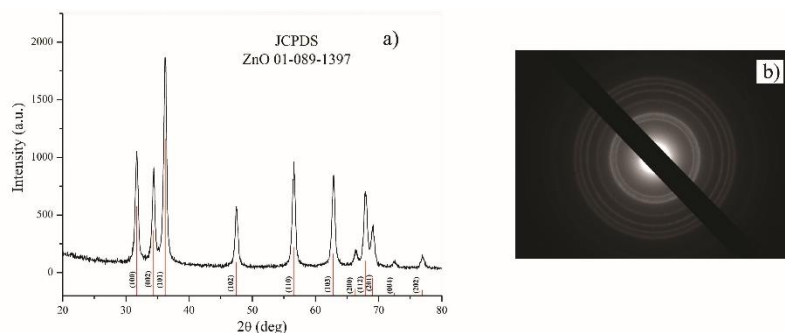


Рисунок 3.5 - Рентгендифракційний зразок ZnO (JCPDS 01-089-1397) (а) електронна дифракція ZnO (б).

Мікроструктура отриманих ZnO-НЧ, нанесених на скляну підкладку була охарактеризована за допомогою СЕМ (рис. 3.6). ZnO-НЧ мали рівномірний діаметр, довжину та кристалічну структуру. Середній діаметр ZnO-НЧ був близько 50 нм, а довжина – могла сягати до 500 нм.

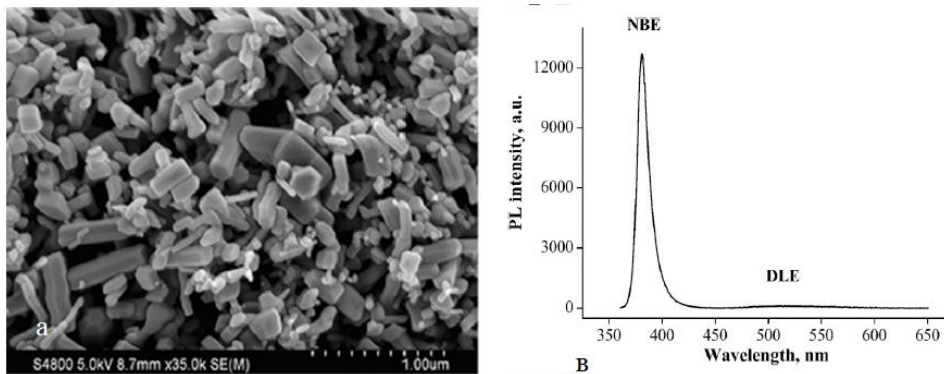


Рисунок 3.6 – Характеристика паличкоподібних частинок оксиду цинку: а) скануюча електронна мікроскопія, в) визначення флюоресцентних спектрів за допомогою оптичного волоконного спектрометра

Рамановий спектр субстрату на основі скла ZnO-НЧ / скло показав, що пік Рамана на 383 cm^{-1} відповідає полярному оптичному A1 (TO) фононний режим, пік на 439 cm^{-1} , який присвоюється неполярному E2 (високий) режим і пік на 332 cm^{-1} , який можна призначити E2, високий- E2, низький режим. Вершини Рамана, які спостерігаються між 570 та 650 cm^{-1} , можуть бути пов'язані з структурними порушеннями, такими як наявність кисню, Zn та їх сполук. Різкий Раман E2 режим і зображення SEM схвалюють ідеальну структуру вурцитів ZnO як нанороди.

Фотолюмінесцентні спектри при кімнатній температурі (RT-PL) чистої скляної основи на яку нанесено ZnO-НЧ відображені на рис. 9 б. Зареєстрований спектр фотолюмінісценції має дві вершини: вузький і інтенсивний пік (центр якого знаходиться на 380 нм) і широкий несиметричний пік (центр якого - 520 нм). Піки фотолюмінесцентних викидів у крайній смузі та широкі глибокі рівні випромінювання або видима люмінесценція через екситонові переходита дефектних викидів відповідно свідчать про приналежність досліджуваної речовини до ZnO.

Після іммобілізації gp51 та блокування gp 51/ZnO-НЧ/скло і gp51/ПАГ/ZnO-НЧ/склоBSAgp51 + BSA/ZnO-НЧ/скло було сформовано структури gp51+BSA/ПАГ/ZnO-НЧ/скло. Аналіз зразків методом фотолюмінесцентної спектроскопії продемонстрував, що PL-спектри чистого ZnO-НЧ/ скло мають суттєві відмінності після іммобілізації gp51 та BSA. Зокрема, іммобілізація gp51 призвела до зниження інтенсивності PL, тоді як модифікація gp51 ZnO-НЧ/ скло BSA призвела до підвищення інтенсивності PL. Іммобілізація gp51 та BSA на поверхні ПАГ/ZnO-НЧ/ скло привели до формування gp51+BSA/ПАГ/ZnO-НЧ/ структури. Під час етапу модифікації ПАГ/ZnO-НЧ/ скло на gp51 збільшувалася фотолюмінесценція gp51+BSA/ПАГ/ZnO-НЧ/скло та на етапі модифікації за рахунок BSA зменшення інтенсивності ФЛ спостерігалось протягом gp51+BSA/ПАГ/ZnO-НЧ/скло. На формування біоселективних шарів (gp51 або gp51 + BSA) впливає електростатична взаємодія між білками (gp51 та BSA) та ZnO-НЧ/скло.

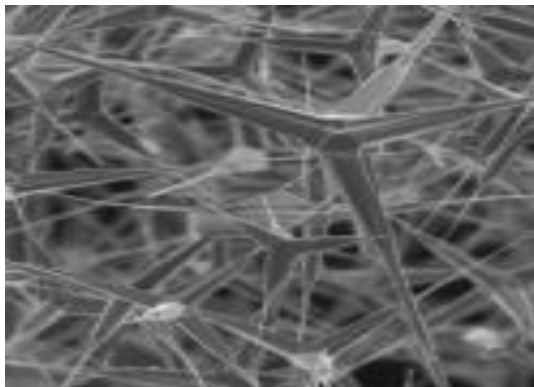


Рисунок 3.7 – СЕМ тетраподальних наночастинок ZnO

Тетраподальні наночастинки цинку оксиду, демонструють кристалічну структуру вюрциту і ростуть уздовж осі с (рис. 3.7). Руки були орієнтовані один по відношенню до одного під кутом $109,5^\circ$. Руки тетраподів мають діаметр 3-5 мкм проксимальний і близько 1 мкм дистальний від центру. Довжина арсеналу між 15-20 мкм.

3.2 Характеристика біополімера (хітозану)

Аналіз інфрачервоної спектроскопії на перетворення Фур'є (FTIR) Рентген-структурний аналіз хітозану демонструє широкі дифракційні піки при $2\theta \sim 10^\circ$ та 20° , які є типовими для напівкристалічного хітозану.

Кристалічна будова хітозану забезпечується водневими зв'язками між відповідними гідроксильними та N-ацетильними групами. Кожен кристалічний пік характеризує кристалографічну структуру, яка утворюється з паралельних та антипаралельних ліній полімерних ланцюгів.

На рис. 3.8 представлені спектри FTIR сировинного полімеру та отриманих біоматеріалів. Чистий хітозановий спектр демонструє деякі типові смуги, що виходять із вільного гідроксилу на 3359 см^{-1} , а також аміногрупи при 1594 см^{-1} та 1151 см^{-1} (одиниць деацетилювання). Полоси з максимальною довжиною 2930 см^{-1} 2874 см^{-1} відповідають аліфатичним групам. Діапазон з максимумом 1649 см^{-1} характерний для амідних зв'язків, присутніх в ацильованих одиницях. Діапазон розміром 1066 см^{-1} походить від глікозидних зв'язків між хітозанами, тоді як діапазон на 893 см^{-1} характерна для піранозних кілець. FTIR-спектри всіх зразків демонструють зміни, що підтверджують процес зшивання, такий як підвищена інтенсивність діпазонів, характерних для амідних зв'язків та вільних аміногруп, що надходять з амінокислот. Можна помітити, що спостерігаються нові діпазони, що виходять із карбоксильних груп ($3270\text{--}3136\text{ см}^{-1}$), яка може утворитися внаслідок незначної деградації поверхні. Кислі групи можуть також походити з прищеплених амінокислот. Ще одна суттєва зміна - це підвищена інтенсивність випромінювання, характерна для амідних зв'язків, що доводить реакцію між карбоновими групами, що надходять з амінокислот, і вільними аміногрупами, що надходять з хітозану ($1668\text{--}1634\text{ см}^{-1}$). У той же час діпазони що відповідають вільним аміногрупам, все ще присутні ($1588\text{--}1578\text{ см}^{-1}$; $1156\text{--}1148\text{ см}^{-1}$). Зазначене свідчить про зшивання хітозану з одночасним збереженням функціональних груп. Можна також зауважити, що мікрохвильові випромінювання не спричиняло суттєвої деградації полімерів, оскільки не змінюються смуги, що надходять від глікозидних зв'язків ($1073\text{--}1067\text{ см}^{-1}$), а також піранозних кілець ($902\text{--}890\text{ см}^{-1}$). Смуги, характерні для аліфатичних груп, також все ще помітні ($2931\text{--}2923\text{ см}^{-1}$; $2879\text{--}2855\text{ см}^{-1}$). В цілому, можна припустити,

що отримані біоматеріали володіють властивостями хітозану та набувають нових біологічних якостей у зв'язку зі збільшенням кількості вільних функціональних групи. Результати також показують, що можна отримати зшитий матеріал без застосування оцтової кислоти, яка може мати цитотоксичну дію на клітини .

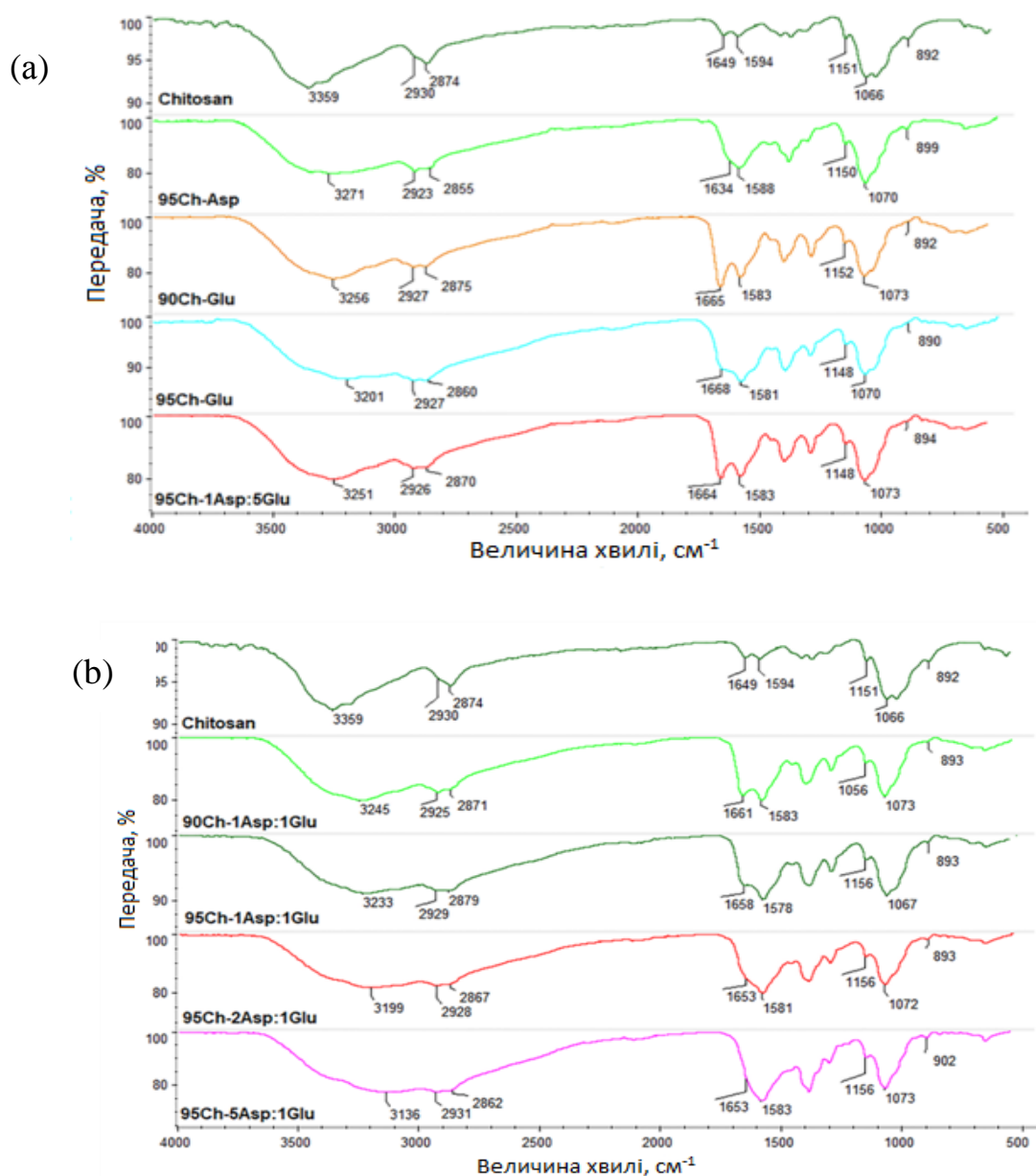


Рисунок 3.8 - (а) FT-IR-спектри чистого хітозану та аерогелів, отримані за допомогою хітозанового зшивання з використанням глутамінової та аспарагінової кислоти. (б) FT-IR-спектри чистого хітозану та аерогелів, отримані за допомогою хітозанового зшивання з використанням глутамінової та аспарагінової кислоти.

Спираючись на дані, зібрані з спектрів FTIR, хімічна структура біоматеріалів була запропонована, як показано на малюнку 3.9.

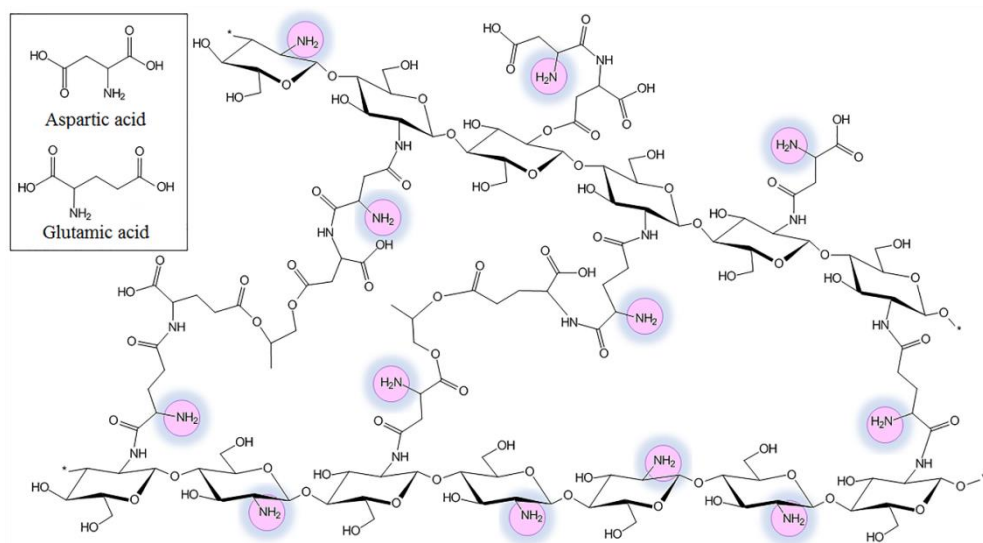


Рисунок 3.9 – Запропонована хімічна структура зшитого з глутаміновими та аспарагіновими кислотами аерогелю.

Вивчаючи пористість і щільність зразків можна помітити, що всі вони мають відмінну пористість, яка вище 90%, що наводить на думку про те, що полімерні матеріали будуть здатні поглинати більшу кількість водних розчинів і брати участь у формуванні згустку крові (рис. 3.10 а). Висока пористість є ефектом процесу зшивання, а також ліофілізації. Найвища пористість мала місце у зразках, що містять у своїй структурі обидві амінокислоти, проте лише до певного моменту. Низька пористість (95Ch-5Asp: 1Glu) була спричинена великою кількістю амідних зв'язків і розгалуженої структури в результаті інтенсивного зшивання. Наявність пор сильно корелює із здатністю набрякати у потенційних кровоспинних засобах. Усі зразки також мають дуже низьку щільність, характерну для аерогелів (рис. 3.10b).

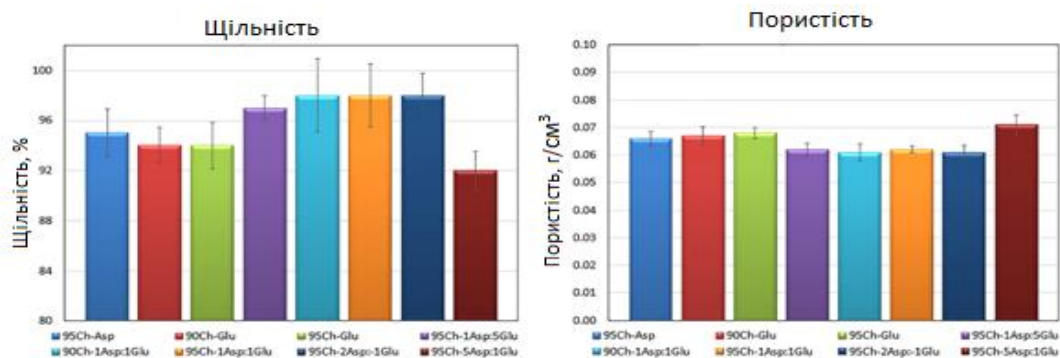


Рисунок 3.10 – (а) Пористість та (б) щільність аерогелів, отриманих за допомогою хітозанового зшивання з використанням глутамінової та аспарагінової кислоти.

Запропоновані кровоспинні засоби призначені спеціально для поверхневих ран. Тому вони повинні не тільки запобігати втраті значної кількості крові, але й сприяти регенерації пошкоджених тканин. Для успішного відновлення шкіри забезпечуються належні можливості в процесі загоєння, наприклад, відповідна швидкість передачі водяної пари (ШПВП), порівняно з іншими препаратами. Відомо, що необхідне значення ШПВП відрізняється у випадку здорових тканин та рани. Отримані нами результати (рис. 3.11) показують, що всі підготовлені аерогелі мають дуже високий

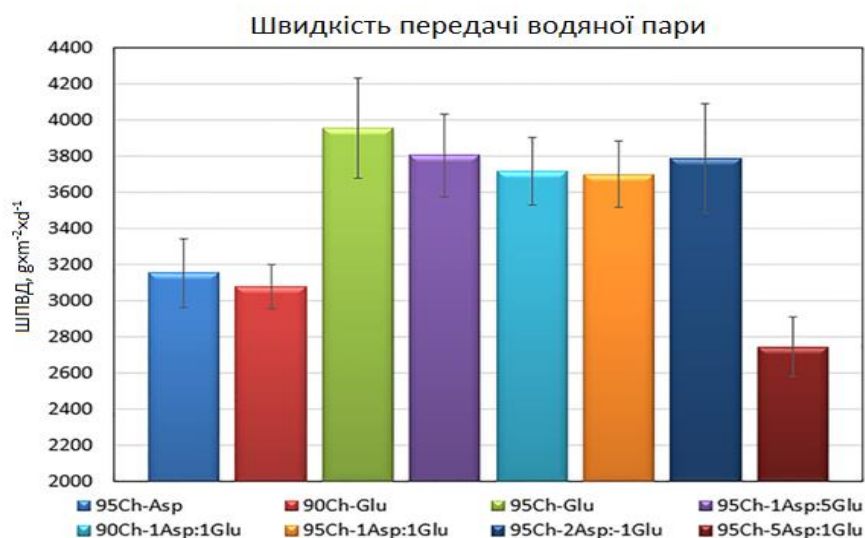


Рисунок 3.11 – Швидкість передачі водяної пари аерогелів, приготовлених шляхом зшивання, використовуючи глутамінову та аспарагінову кислоти.

ШПВП, який бажаний у випадку пошкодження епідермісу та дерми, які перебувають у процесі регенерації. Можна помітити, що параметр у більшості випадків корелює з пористістю.

Під час будь-якого пошкодження тканин може виникати окислювальний стрес і утворюються вільні радикали. Це може призвести до апоптозу клітин через білки та пошкодження генетичного матеріалу [82]. Тому для захисту біологічних макромолекул слід застосовувати антиоксиданти. Хітозан відомий за його антиоксидантної активності, яка асоціюється з вільними аміногрупами, а також піриновими кільцями. Однак хімічна модифікація може зробити негативний вплив на цю властивість через зменшення вільних NH_2 груп. На малюнку 3.12 представлені результати дослідження антиоксидантної активності зразків проти радикалівДФПГ (2,2-дифеніл-1-пікрилгідрозилу).

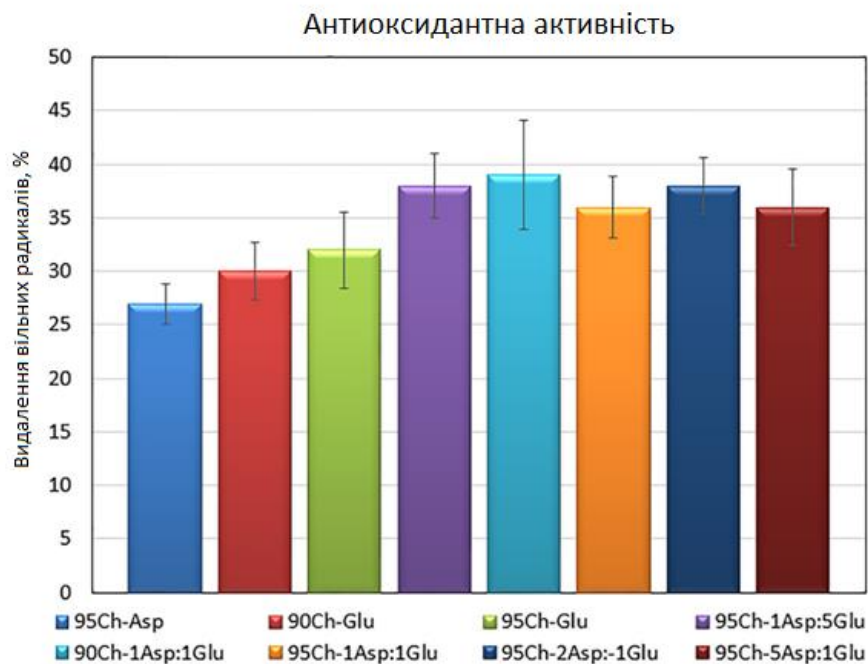


Рисунок 3.12 – Антиоксидантна активність аерогелів, отриманих за допомогою процесів поперечної зшивки звикористанням глутамінової та аспарагінової кислоти протиДФПГ вільних радикалів.

Можна помітити, що всі з досліджених аерогелей мають здатність до утворення вільних радикалів, і ця властивість корелює з сшиваючими агентами, зразки які зшиті з двома амінокислотами, мають значно вищу антиоксидантну здатність. Такі результати можуть бути пояснені великою кількістю вільних аміногруп, що надходять від обох аміноглікозидів хітозану, а також з'єднаних амінокислотних ланцюгів [28]. Отримані результати свідчать про те, що запропоновані біоматеріали можуть мати захисний вплив на біомолекули та клітини.

Запропоновані кровоспинні засоби призначені для різних застосувань. Вони можуть бути використані під час операції, щоб запобігти втраті крові, або вони можуть бути застосовані на поверхневих і глибоких ранах, щоб зупинити кровотечу і сприяти загоєнню ран. Тому вони повинні біологічно розкладатися до нетоксичних речовин за короткий проміжок часу. Чистий хітозан біологічно розкладається в умовах *in vitro* та *in vivo* на ферменти, які розривають глікозидні зв'язки. Однак його хімічна модифікація, що призводить до утворення нових хімічних зв'язків, а також включення зшиваючих, фотоініціюючих та інших молекул, може істотно перешкоджати цій властивості та викликати цитотоксичність та пірогенний вплив через зниження місцевого рН. На малюнку 3.14 а представлено результати дослідження деградації в імітуючій рідині тіла (СБФ) упродовж семи днів,

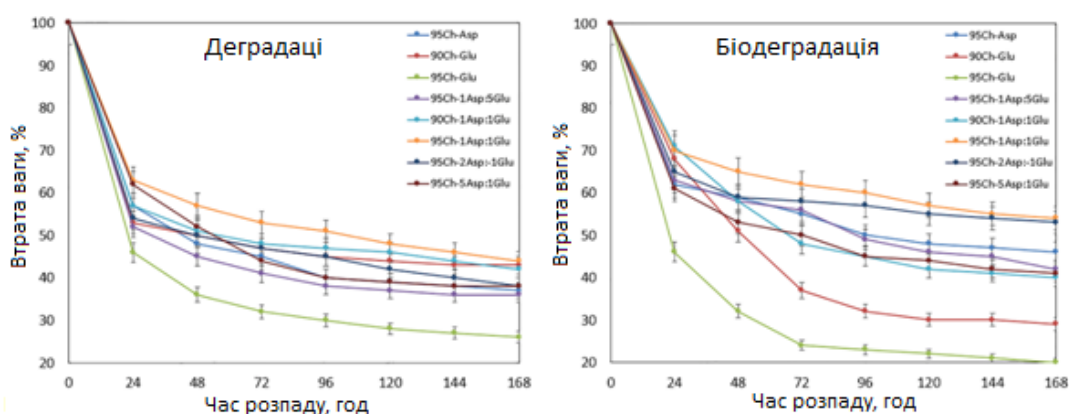
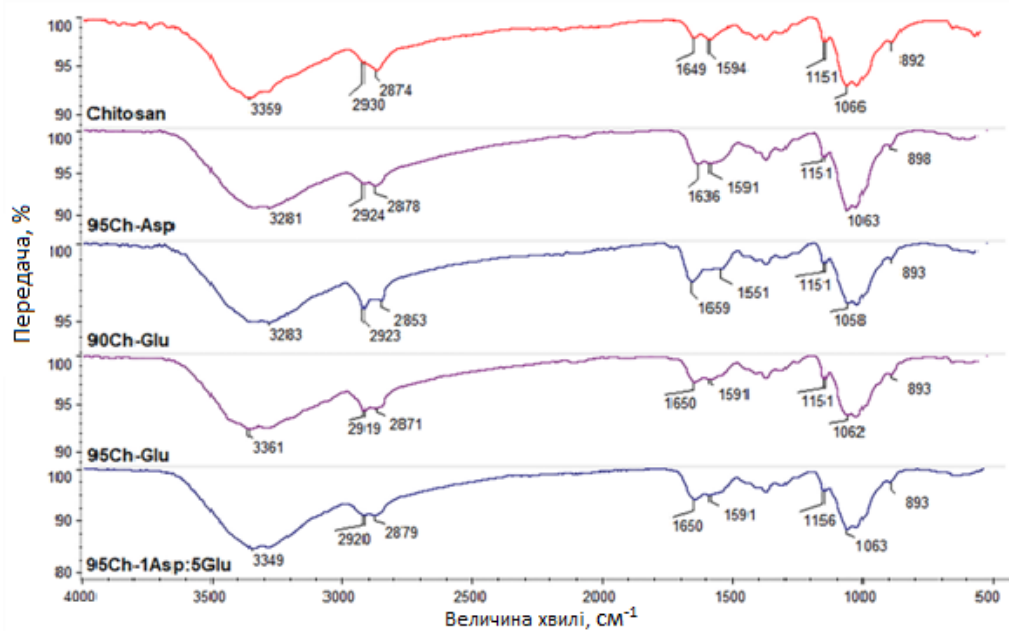


Рисунок 3.14 (а)—*In vitro* деградація гемостатичних агентів у стерильній імітованій рідині тіла (SBF);(б)дослідження біодеградації *in vitro* для SBF, що впливає на лізоцим людини

тоді як рис. 3.14 б показані результати біодеградації з лізоцимом. Можна помітити, що найвища швидкість (біо) деградації відбувається протягом перших 24 год. Усі досліджувані зразки підлягають біологічному розкладанню до 80% протягом одного тижня. Немає явного зв'язку між хімічним складом зразків і сприйнятливістю до деградації. Можна також зауважити, що аерогель розкладається подібним чином в обох середовищах.

Як показано на малюнку 3.15 а, б, усі зразки втратили вагу навіть до 80%. Спектри ІЧ-Фур'є показують, що втрата ваги сталася в результаті гідролізу амідних зв'язків, в першу чергу, а також до ферментативного розриву бета-глікозидних зв'язків між хітозановими мономерами. Активність лізоциму не має істотного впливу на швидкість біологічного розпаду протягом перших днів біодеградації. FTIR дослідження показало, що на першому етапі біодеградації, вбудовані амінокислоти видаляються з основного кола полімеру, який підтверджує значне зниження інтенсивності смуг, характерних для амідних зв'язків і вільних аміногруп. У той же час зміни інтенсивності смуг, що надходять від піринових кілець, а також O-містків між полімерними одиницями дуже малі. Можна помітити, що спектри FTIR гемостатичних агентів після семиднів інкубації в SBF, що містить лізоцим, майже ідентичні FTIR нативного хітозану. Тому можна констатувати, що біодеградація відбувається у два етапи. У першому хітозан змінює свою структуру з розгалуженої на лінійну, тоді як на другій стадії полімер перетворюється на олігомери, які можуть бути включені в певні клітинні цикли, а також природним чином виведені з організму іншими рідинами. Можна також припустити, що повільне вивільнення амінокислот (L-аспартанової та L-глутамової кислоти) не спричинять значних пірогенних впливів, оскільки вони природним чином виникають в організмі людини і мають нижчу кислотність, ніж, наприклад, молочна кислота. Отримані дані демонструють, що всі зразки є біодеградуєчими і можуть застосовуватися *in vivo* під час операцій без необхідності повторної операції пацієнта через деякий проміжок часу.

(a)



(b)

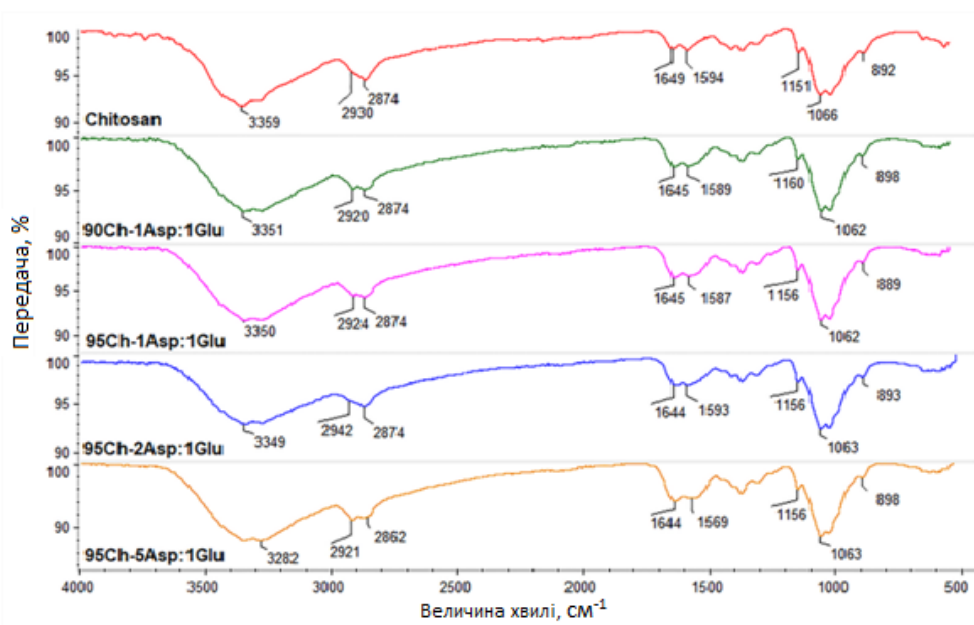


Рисунок 3.15 –(а) FTIR-спектри зразків після біодеградації;(б) FTIR-спектри зразків після біодеградації.

На рисунку 3.16 показана величина сорбційної здатності усіх типів хітозанових губок, що становить від 700% до 2400% від початкової маси. Але 95Ch-1Asp: 5Glu, 90Ch-1Asp: 1Glu, 95Ch-1Asp: 1Glu і 95Ch-2Asp: 1Glu забезпечують значно кращу сорбцію. Звичайний односторонній тест ANOVA

показує значні відмінності між сорбційною здатністю ($p \leq 0.0001$). Сорбція крові є критичною стадією під час гемостазу з використанням перев'язувальних матеріалів та майбутнього розвитку, також матеріальна ефективність сильно залежать від цієї початкової стадії.

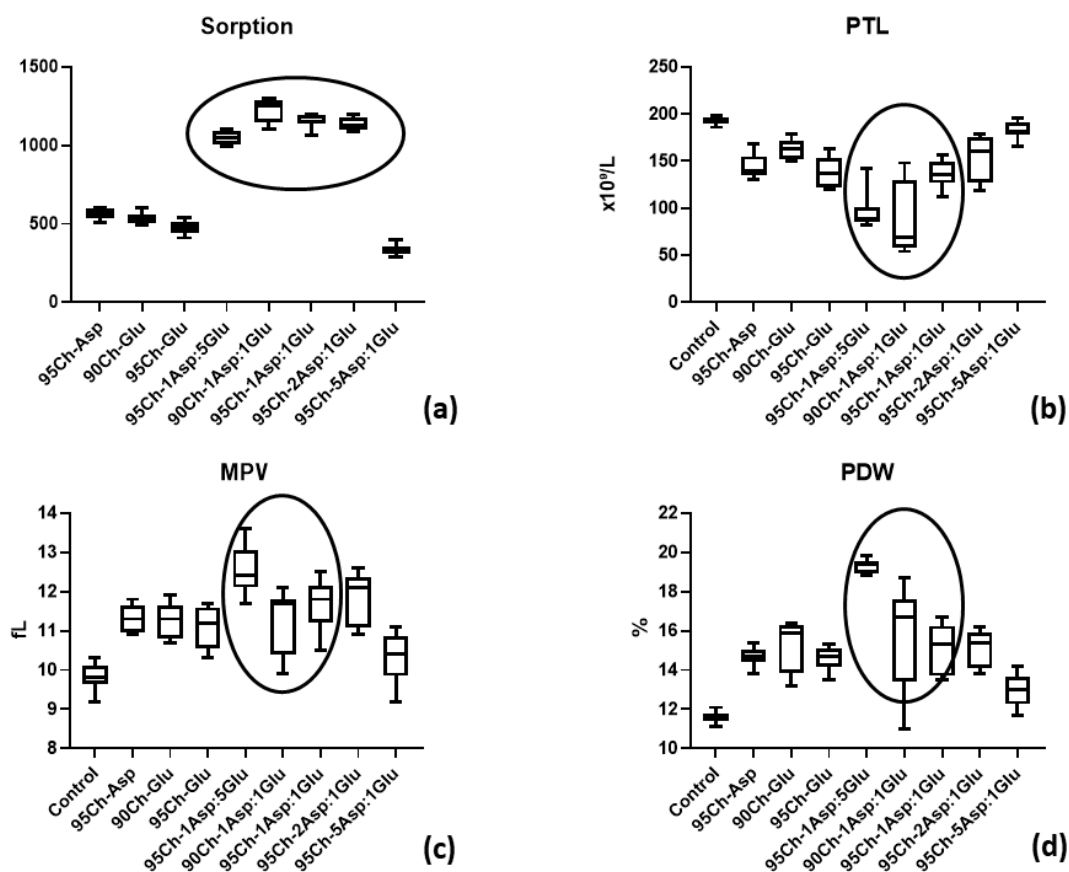


Рисунок 3.16 – (а) Сорбція крові за допомогою хітозанових губок та (б) тромбоцитів (PLT), (с) середнього обсягу тромбоцитів (MPV) та (д) параметрів ширини розподілу тромбоцитів (PDW) після тесту на згортання крові.

SEM демонструє (рис. 3.17) розподіл клітин крові на губках, але кількість клітин відрізняється і залежить від типу губки. Клітини крові здебільшого повністю вкривають зразки 95Ch-Glu, 95Ch-1Asp: 5Glu, 90Ch-1Asp: 1Glu та 95Ch-1Asp: 1Glu і проникають у пори. Інші зразки дали менше клітин, які утворюють окремі агрегати, і навіть, неміцно з'єднуються з поверхнею губки. Ми можемо бачити, м'яку речовину по осередках у зразках: 95Ch-1Asp: 5Glu, 90Ch-1Asp: 1Glu і 95Ch-1Asp: 1Glu, що ймовірно є білки крові, в тому числі

тромбін, який є основним компонентом тромбу. Ми можемо спостерігати, що ця речовина здійснює зв'язок між клітинами та губкою. Результати адгезії клітин перевершують отримані результати з сировинним хітозаном.

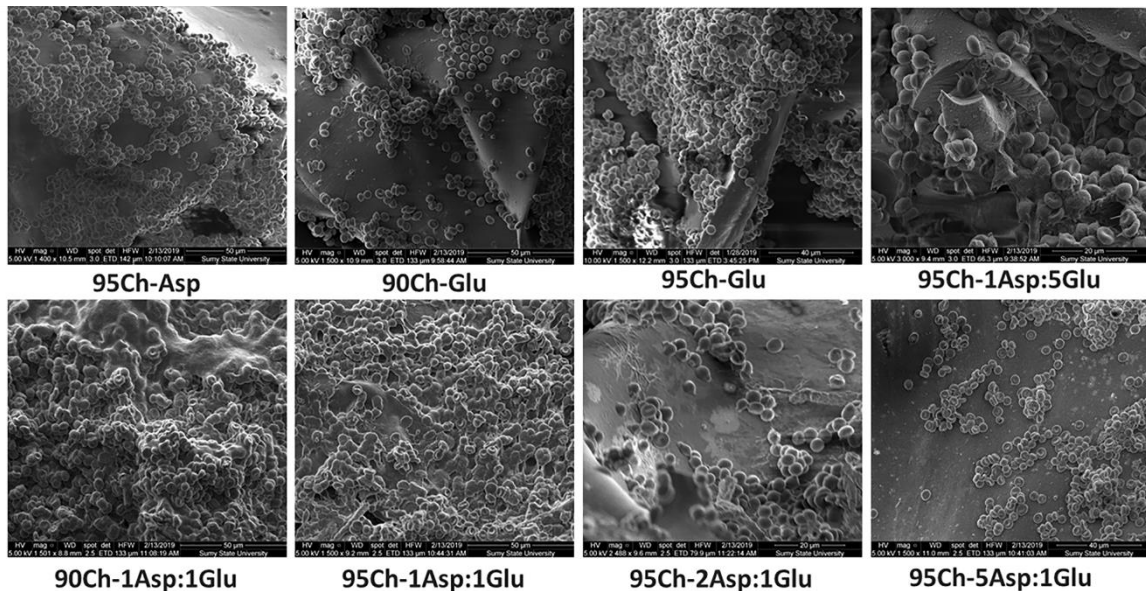


Рисунок 3.16 – Скануюча електронна мікроскопія хітозаної губки після тесту на згортання крові з адгезованими кров'яними клітинами .

3.3 Характеристика гідроксиапатиту

Середній розмір кристалів ГА становить майже 70-80 нм (рис. 3.17). Формування фази гідроксиапатиту підтверджується рентгенограмами (рис.

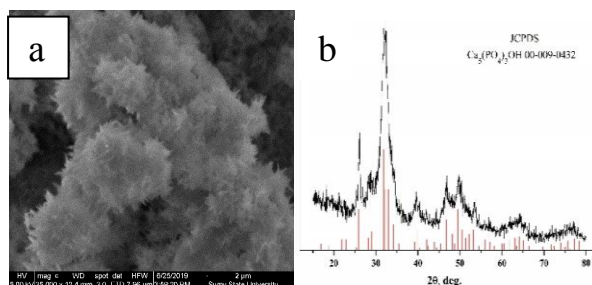


Рисунок 3.17 – СЕМ (а) та електронна дифракція (б) гідроксиапатиту

3.17, б). Наявні характерні для гідроксиапатиту піки – широкий пік відбиття в діапазоні 31,8 - 32,50 від 2θ значень, що відповідає характерному піку фази апатиту (згідно картки JCPDS №9-0432).

3.4 Антимікробна активність досліджуваних речовин

Антимікробні властивості хітозанових губок досліджувались на грампозитивних (*S. aureus*) та грамнегативних (*E. coli*) мікроорганізмах. Усі досліджувані зразки продемонстрували антибактеріальну активність щодо обох типів мікроорганізмів. Узагальнені результати представлені в таб. 3.1, 3.2.

Таблиця 3.1– Час залежна активність губок хітозану проти *E.coli*

Час інкубації (год)	Зразок / К-сть ізольованих мікроорганізму логарифмах							
	95Ch- Asp	90Ч- глю	95Ч- глю	95Ch- 1Asp: 5Glu	90Ch- 1Asp: 1Glu	95Ch- 1Asp: 1Glu	95Ch- 2Asp: 1Glu	95Ch- 5Asp: 1Glu
0	4	4	4	4	4	4	4	4
2	2	3.7	0	2	3.5	2	0	0
4	2	2	0	0	2	2	0	0
6	0	0	0	0	2	2	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0
24	0	0	0	0	0	0	0	0

Таблиця 3.2 – Час залежна активність губок хітозану проти *S. aureus*

Час інкубації(год)	Зразок / К-сть ізольованих мікроорганізму логарифмах							
	95Ch- Asp	90Ч- глю	95Ч- глю	95Ch- 1Asp: 5Glu	90Ch- 1Asp: 1Glu	95Ch- 1Asp: 1Glu	95Ch- 2Asp: 1Glu	95Ch- 5Asp: 1Glu
0	4	4	4	4	4	4	4	4
2	2	2	0	2	2	0	2	2
4	5	3	0	3	4	0	5	3
6	5	5	0	4.7	5	0	6.7	5.7
8	5	6.7	0	6.7	6.7	0	6.7	0
10	5	6.7	0	6.7	6.7	0	6.7	0
24	5	6.7	0	6.7	6.7	0	6.7	0

Дослідження час залежної активності хітозанових губок відносно *E. coli* показало поступове зниження кількості життєздатних клітин, порівняно з інокульованою кількістю, через 2, 4, 6 год інкубації, з повною руйнацією бактерій наприкінці культивування (24 год). Найбільш ефективними проти *E. coli* були зразки: 95Ch-Glu, 95Ch-2Asp: 1Glu і 95Ch-5Asp: 1Glu, що викликали повну деконтамінацію вже через 2год інкубації.

На противагу цьому антимікробна активність хітозанових губок проти *S. aureus* була не такою однозначною. Губки 95Ch-Glu та 95Ch-1Asp: 1Glu продемонстрували найкращу бактерицидну дію, і всі мікроби були вбиті через 2 год інкубації. 95Ch-5Asp: 1Glu губки спочатку продемонстрували слабку антибактеріальну ефективність, що супроводжувалась незначним збільшенням кількості бактерій протягом 6 год інкубації, яке однак зкінчилось повною елімінацією мікроорганізмів через 8 год. У той же час всі інші композиції виявляли меншу інгібуючу дію проти *S. aureus* порівняно з *E. coli*. М'яке пригнічення бактеріального росту в першій 4 год інкубації було змінено найбільш різким зростанням мікробної концентрації у культуральному середовищі з максимальною концентрацією мікроорганізмів після 24 год інкубації.

Активність композиту гідроксиапатит-ZnO оцінювали щодо грампозитивних та грамнегативних бактерій. Чисті наночастинки ГА не виявляли антибактеріальної дії. Однак матеріал ГА-ZnO продемонстрував антибактеріальні властивості, які залежали від концентрації наночастинок ZnO в розчині, проти обох типів мікроорганізмів (рис. 3.18).

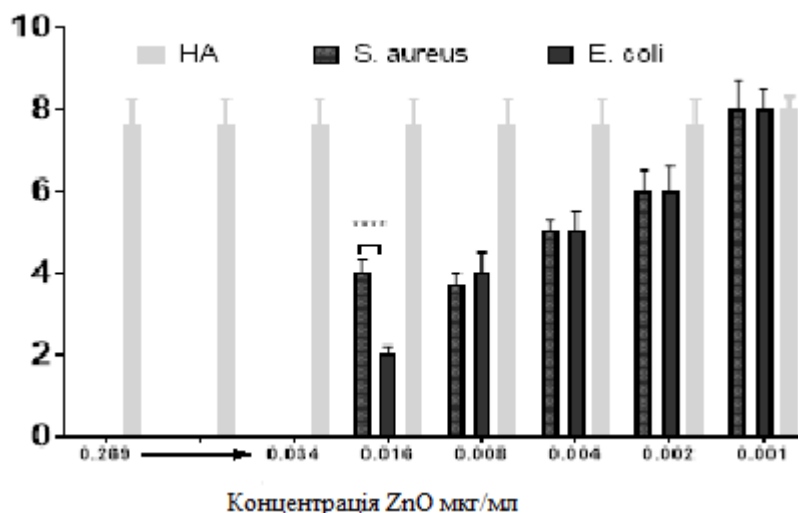


Рисунок 3.18 – Порівняння антибактеріальної активності ГА-ZnO проти *S. aureus* та *E. coli*

Загальне пригнічення росту *S. aureus* та *E. coli* спостерігалось при концентрації ZnO 0,034 мг/мл, яка може розглядатися, як мінімальна

бактерицидна концентрація для цих мікроорганізмів. Композит ГА-ZnO з концентрацією наночастинок ZnO від 0,016 до 0,002 мг/мл спричиняв пригнічення росту мікроорганізмів і статистично достовірне ($p < 0,0001$) зниження кількості мікроорганізмів. Крім того, композит гідроксиапатиту з наночастинками ZnO у концентрації 0,016 мг/мл, ефективніше впливав на грамнегативні мікроорганізми, ніж на грампозитивні ($p < 0,0001$).

Вивчення антибактеріальної активності тетраподальних частинок цинку оксиду показало, що MIC для частинок T-ZnO проти *E. coli* становив $4,4 \pm 0,59$ мг/мл. Поєднання T-ZnO з наночастинками хітозану та наночастинками міді призводило до суттєвого впливу на їх антибактеріальну активність (ANOVA, $p \leq 0,0001$). Як показано на рис. 3.19, додавання хітозану у оцтовому буфері та наночастинок Cu призводить до значного зниження T-ZnO MIC до $2,06 \pm 0,26$ ($p=0,0009$) та $1,68 \pm 0,27$ ($p=0,0001$) мг/мл.

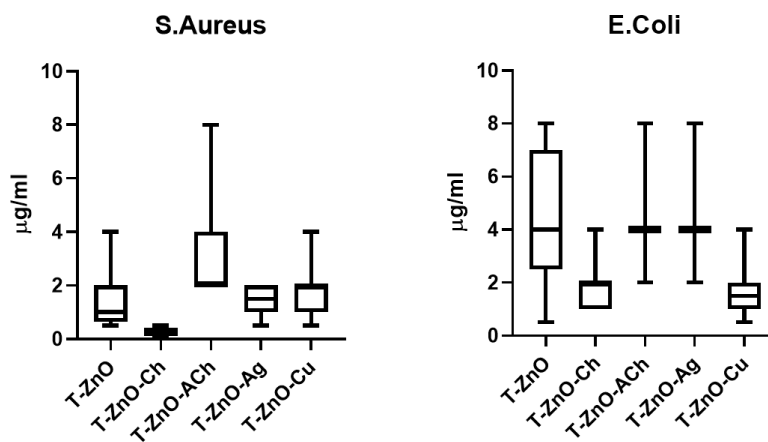


Рисунок 3.19 – MIC композитів T-ZnO і T-ZnO для *S. aureus* та *E. coli*

Додавання водорозчинного хітозану, на противагу, призводило до зростання MIC до $3,125 \pm 0,40$ ($p = 0,0001$) мг / мл. Додавання наночастинок Ag та Cu суттєво не впливало на антибактеріальну активність T-ZnO. Тетраподи-ZnO виявились більш ефективними проти *S. aureus* (MIC $1,5 \pm 0,28$ мг/мл) у порівнянні з *E. coli* (ANOVA, $p \leq 0,0001$).

3.5 Механізми антимікробного впливу наночастинок міді та срібла на *K. pneumoniae* та *E.coli*

Особливості впливу досліджуваних наночасточок AgNPs та CuNPs на морфологію грамнегативних мікроорганізмів було досліджено із

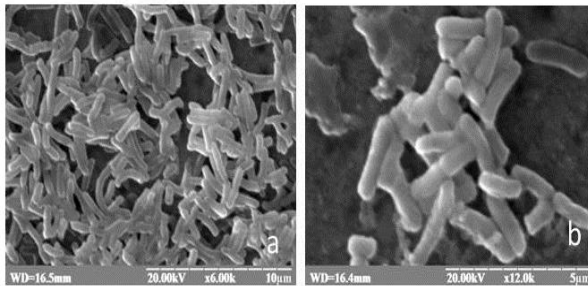


Рисунок 3.20 – Скануюча електронна мікроскопія *K. pneumoniae* (a) та *E.coli* (b)

використанням скануючого електронного мікроскопа. Результати представлено на рисунках 3.20 та 3.21. Як показано на рис. 3.20, клітини групи контролю мали паличкоподібну форму, гладку поверхню та

неушкоджену клітинну стінку. У той же час морфологія мікроорганізмів,

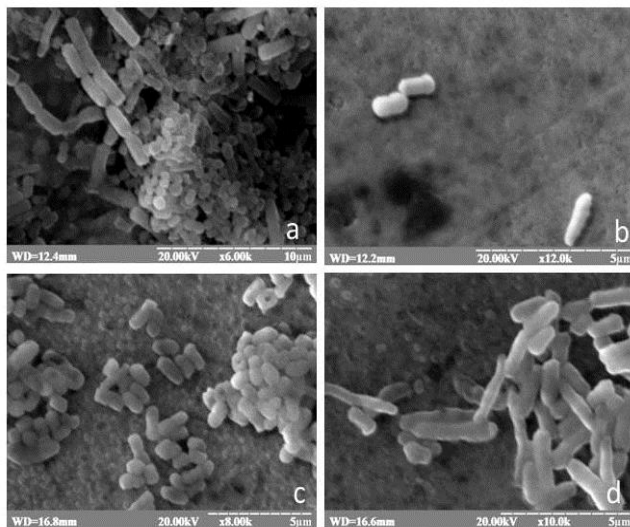


Рисунок 3.21 – Скануюча електронна мікроскопія *K. pneumoniae* за наявності Cu NPs (a), Ag NPs (b) та *E.coli* у присутності Cu NP (c), Ag NPs (d)

оброблених НЧ (рис. 3.21), була кардинально змінена. Зокрема дія НЧ Cu призводила до формування великої кількості коккобактерій. Поверхня клітин, які підлягали впливу наночастинок Ag ставала шорсткою з потовщенням на кінцях клітин після культивування. Наведені нижче результати (табл. 3.2) відображають особливості зміни морфології бактеріальних клітин під впливом нанометалів.

Як це відображено в таблицях 3.3, 3.4 розміри клітин *K. pneumoniae* та *E. coli* в контрольних зразках відповідали нормальним показникам для цих

культування. Наведені нижче результати (табл. 3.2) відображають особливості зміни морфології бактеріальних клітин під впливом нанометалів.

Як це відображено в таблицях 3.3, 3.4 розміри клітин *K. pneumoniae* та *E. coli* в контрольних зразках відповідали нормальним показникам для цих

культування. Наведені нижче результати (табл. 3.2) відображають особливості зміни морфології бактеріальних клітин під впливом нанометалів.

Як це відображено в таблицях 3.3, 3.4 розміри клітин *K. pneumoniae* та *E. coli* в контрольних зразках відповідали нормальним показникам для цих

культування. Наведені нижче результати (табл. 3.2) відображають особливості зміни морфології бактеріальних клітин під впливом нанометалів.

Як це відображено в таблицях 3.3, 3.4 розміри клітин *K. pneumoniae* та *E. coli* в контрольних зразках відповідали нормальним показникам для цих

культування. Наведені нижче результати (табл. 3.2) відображають особливості зміни морфології бактеріальних клітин під впливом нанометалів.

Як це відображено в таблицях 3.3, 3.4 розміри клітин *K. pneumoniae* та *E. coli* в контрольних зразках відповідали нормальним показникам для цих

культування. Наведені нижче результати (табл. 3.2) відображають особливості зміни морфології бактеріальних клітин під впливом нанометалів.

Як це відображено в таблицях 3.3, 3.4 розміри клітин *K. pneumoniae* та *E. coli* в контрольних зразках відповідали нормальним показникам для цих

мікроорганізмів. Що становило відповідно $1,9944 \pm 0,6219$ мкм і $0,8028 \pm 0,1705$ мкм.

Таблиця 3.3 – Зміни морфометричних показників *K. Pneumoniae* під впливом наночастинок

	Товщина (мкм)	Довжина (мкм)
Контроль	0.4413±0.0571	1.9994±0.6219
NPs Cu	0.3272±0.0939	0.8028±0.1705
NPs Ag	0.5073±0.0737	1.2652±0.2665
	Радіус (мкм)	Об'єм (мкм ³) ^b
Контроль	0.2479±0.0352	0.3561±0.001712
NPs Cu	0.3272±0.0341	0.1041±0.001495
NPs Ag	0.2423±0.0407	0.3208±0.001368

Таблиця 3.4 – Зміни морфометричних показників кишкової палички під впливом наночастинок

	Товщина (мкм)	Довжина (мкм)
Контроль	0,4916±0.0708	1,9350±0,3904
NPs Cu	0,5947±0,1119	1,0665±0,3665
NPs Ag	0,5060±0,0881	1,8103±0,6829
	Радіус (мкм)	Об'єм (мкм ³) ^b
Контроль	0,2770±0,0539	0,4371±0,0018
NPs Cu	0,3292±0,0388	0,4179±0,0041
NPs Ag	0,2786±0,0299	0,4385±0,0210

Після дії Cu NPs та Ag NPs спостерігалось вкорочення клітини *K. pneumoniae*, довжина яких становила відповідно $0,8028 \pm 0,1705$ м і

1,2652 ± 0,2665 мкм. Крім того, після інкубації *K. pneumoniae* з Ag NPs було виявлено значне зменшення кількості бактерій.

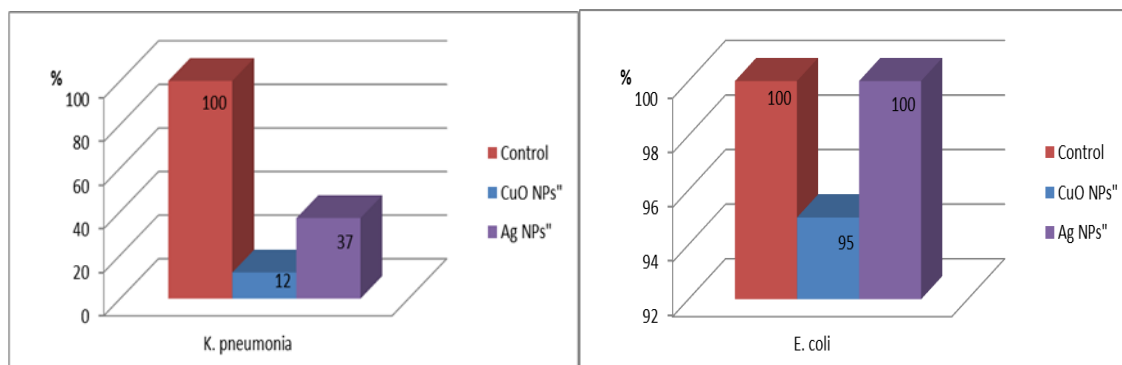


Рисунок 3.22 – Зміни об'ємів клітин бактерій експериментальних груп порівняно з контролем

Аналогічні зміни були виявлені після інкубації *E. coli* з Cu NP. Бактерії стали коротшими, ніж у контрольній групі (довжина 1,0665 ± 0,3665 мкм). Інкубація з Ag не спричинила суттєвого впливу на розмір клітин, але поверхня бактерій стала більш нерегулярною і шорсткою. Об'єм клітин зменшився в обох експериментальних групах (рис. 3.22). Крім того, виявлено зменшення об'єму клітин *K. pneumoniae*.

ВИСНОВКИ

1. У роботі проведено синтез наночастинок срібла, міді та оксиду цинку із використанням різних підходів. Проведено фізико-хімічний аналіз отриманих часточок.
2. Дсліджено антимікробні властивості отриманих наночастинок відносно полірезистентних клінічних ізолятів та встановлено наявність антимікробної активності усіх синтезованих сполук відносно планктонних та біоплівкових форм мікроорганізмів.
3. Наночастини срібла та міді спричиняють значні зміни в морфологічній структурі грам негативних бактерій, які проявляються укороченням клітин бактерій, порушенням поверхні клітинної стінки та механізму поділу клітин.
4. У результаті виконаних синтезів були отримані зшиті аерогелі хітозану та амінокислот без застосування оцтової кислоти, які демонстрували поліпшення біологічних властивостей хітозану та виявляли антибактеріальну активність, як проти грампозитивних, так і грамнегативних бактерій.
5. Композитні матеріали, отримані у результаті змішування готових розчинів наночастинок з хітозаном та гідроксиапатитом, володіли вищою антибактеріальною активністю, порівняно із чистими формами сполук. Обробка наночастинок та їх композитів ультразвуком призводить до суттєвого поліпшення їх антимікробної активності.

ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ

1. Деркач С.А. Мікробіологічні аспекти лікування гнійно-запальних захворювань. Інфекційні хвороби. № 4 (82). С. 5-15.2015.
2. Van Boeckel et al. Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data. *Lancet Infect Dis.* № 14(8). P. 742-750.2014.
3. Luria Leslie Founou, Raspail Carrel Founou, Sabiha Yusuf Essack. Antibiotic Resistance in the Food Chain: A Developing Country-Perspective. *Frontiers in Microbiology.* Volume 7. P 1-19.2016.
4. Luis Martines, Fernando Baquero. Emergence and spread of antibiotic resistance: setting a parameter Space. *Jose Upsala Journal of Medical Sciences.* №119. P. 68–77.2014.
5. Nanoparticles as potential new generation broad spectrum antimicrobial agents Clarence S. Yah 1,2* and Geoffrey S. Simate Yah and Simate DARU *Journal of Pharmaceutical Sciences* (2015) 23:43
6. P.G. Luo and F. J. Stutzenberger, “Nanotechnology in the detection and control of microorganisms”, *Adv. Appl. Microbiol.* (2008), vol. 63, pp. 145-181
7. Ivask A, Kurvet I, Kasemets K, Blinova I, Aruoja V, Suppi S. Size-dependent toxicity of silver nanoparticles to bacteria, yeast, algae, crustaceans and mammalian cells in vitro. *PLoS ONE.* 2014;9(7):e102108. doi: 10.1371/journal.pone.0102108.
8. Maqsood A, Mohamad S, Siddiqu M. Silver nanoparticle applications and human health. *Clin Chim Acta.* 2010;411(23–24):1841–1848.
9. Wang X, Wang Z, Zhang J, Qi H, Chen J, Xu M (2016) Cytotoxicity of AgNPs/CS composite films: Ag NPs immobilized in chitosan matrix contributes a higher inhibition rate to cell proliferation. *Bioengineered* 7(5):283–290
10. Tackling Drug-resistant Infections Globally: Final report and Recommendations. *The review on Antimicrobial Resistance.* Chaired by J. O’Neill. May 2016 [Електронний ресурс]. – Режим доступу: https://amr-review.org/sites/default/files/160525_Final_paper_with_cover.pdf

11. Інфекційна захворюваність населення України [Електроннийресурс].– Режимдоступу: <https://phc.org.ua/kontrol-zakhvoryuvan/inshi-infekciyni-zakhvoryuvannya/monitoring-i-ocinka/infekciyna-zakhvoryuvanist-naselennya-ukraini>.
12. Luis Martines, FernandoBaquero. Emergence and spread of antibiotic resistance: setting a parameter Space. Jose Upsala Journal of Medical Sciences. №119. P. 68–77.2014.
13. Красій Н.І. Біологічні властивості та динаміка формування антибіотикорезистентності мікроорганізмів у хворих зі штучною вентиляцією легень: дис. канд. мед. наук : 03.00.07 – мікробіологія / Тернопіль. держ. мед. ун-т, Тернопіль, 2016 р. 172 с.
14. Mansura S. Mulani, Ekta E. Kamble, Shital N. Kumkar, Madhumita S. Tawre, and Karishma R. Pardesi*Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A ReviewFront Microbiol. 2019; 10: 539.
15. Qiao Lin,¹ Berthony Deslouches,^{1,2} Ronald C. Montelaro,² and Y. Peter Di^{1,*}Prevention of ESKAPE pathogen biofilm formation by antimicrobial peptides WLBU2 and LL37Int J Antimicrob Agents. 2018 Nov; 52(5): 667–672.
16. Asadpour L¹.Antimicrobial resistance, biofilm-forming ability and virulence potential of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients in northern Iran.J Glob Antimicrob Resist. 2018 Jun;13:214-220.
17. Pezhman KaramiAzad KhalediRasool Yousefi MashoofMojtaba Hedayat YaghoobiManoochehr KaramiDara DastanMohammad Yousef AlikhaniThe correlation between biofilm formation capability and antibiotic resistance pattern in *Pseudomonas aeruginosa*Gene ReportsVolume 18, March 2020, 100561
18. The Prevalence, Antibiotic Resistance and Biofilm Formation of *Staphylococcus aureus* in Bulk Ready-To-Eat Foods Qi Lin at all. *Biomolecules* 2019, 9(10), 524;
19. Alternative Approaches to Combat Medicinally Important Biofilm-Forming PathogensBy Mansab Ali Saleemi, Navindra Kumari Palanisamy and Eng Hwa

Wong Submitted: April 29th 2018 Reviewed: July 16th 2018 Published: November 5th 2018 DOI: 10.5772/intechopen.80341

20. Linlin Wang, Chen Hu, Longquan Shao The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future *Int J Nanomedicine* 12 (2017): 1227–1249
21. Anu Mary Ealias and Saravanakumar M P A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application *IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering* 263 (2017) 032019 doi:10.1088/1757-899X/263/3/032019
22. Saba Hasan A Review on Nanoparticles: Their Synthesis and Types Vol. 4(ISC-2014), 1-3 (2015) *Res. J. Recent. Sci.*
23. Krutagn Patel, Bhavesh Bharatiya, Tulsi Mukherjee, Tejal Soni, Atindra Shukla & B. N. Suhagia Role of stabilizing agents in the formation of stable silver nanoparticles in aqueous solution: Characterization and stability study *Journal of Dispersion Science and Technology* Volume 38, 2017 - Issue 5
24. Slavin YN, Asnis J, Häfeli UO, Bach H. Metal nanoparticles: understanding the mechanisms behind antibacterial activity. *J Nanobiotechnology*. 2017 Oct 3;15(1):65
25. Gudepalya Renukaiah Rudramurthy, Mallappa Kumara Swamy Potential applications of engineered nanoparticles in medicine and biology: an update *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* December 2018, Volume 23, Issue 8, pp 1185–1204
26. Surface Modifications of Nanoparticles for Stability in Biological Fluids Luca Guerrini, Ramon A. Alvarez-Puebla, and Nicolas Pazos-Perez 1 *Materials* 2018, 11, 1154;
27. Vidic J, Stankic S, Haque F, Ciric D, Le Goffic R, Vidy A, Jupille J, Delmas B. Selective antibacterial effects of mixed ZnMgO nanoparticles. *J Nano-particle Res.* 2013;15:1595

28. Gordon T, Perlstein B, Houbara O, Felner I, Banin E, Margel S. Synthesis and characterization of zinc/iron oxide composite nanoparticles and their antibacterial properties. *Colloid Surf A*. 2011;374:1–8
29. He W, Kim HK, Wamer WG, Melka D, Callahan JH, Yin JJ. Photogenerated charge carriers and reactive oxygen species in ZnO/Au hybrid nano-structures with enhanced photocatalytic and antibacterial activity. *J Am Chem Soc*. 2014;136:750–7.
30. Sibhghatulla Shaikh,^{1,†}Nazia Nazam,^{2,†}Syed Mohd Danish Rizvi,³Khurshid Ahmad,¹Mohammad Hassan Baig,¹Eun Ju Lee,¹ and Inho Choi^{1,*}Mechanistic Insights into the Antimicrobial Actions of Metallic Nanoparticles and Their Implications for Multidrug Resistance *Int J Mol Sci*. 2019 May; 20(10): 2468.
31. Linlin Wang, Chen Hu, and Longquan ShaoThe antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future *Int J Nanomedicine*. 2017; 12: 1227–1249
32. Yun'an Qing, Lin Cheng, Ruiyan Li, Guancong Liu, Yanbo Zhang, Xiongfeng Tang, Jincheng Wang, He Liu,¹ and Yanguo Qin¹Potential antibacterial mechanism of silver nanoparticles and the optimization of orthopedic implants by advanced modification technologies *Int J Nanomedicine*. 2018; 13: 3311–3327.
33. Minqi Wang Tingting Tang Surface treatment strategies to combat implant-related infection from the beginning *Journal of Orthopaedic Translation* Volume 17, April 2019, Pages 42-54
34. Mara Madalina Mihai,^{1,2}Monica Beatrice Dima,¹Bogdan Dima,¹ and Alina Maria Holban *Nanomaterials for Wound Healing and Infection Control* *Materials (Basel)*. 2019 Jul; 12(13): 2176.
35. Alexandra-Cristina Burduşel,¹Oana Gherasim,^{2,3}Alexandru Mihai Grumezescu,²Laurenţiu Mogoantă,⁴Anton Fici,² and Ecaterina Andronescu²Biomedical Applications of Silver Nanoparticles: An Up-to-Date Overview *Nanomaterials (Basel)*. 2018 Sep; 8(9): 681.

36. Mechanistic Basis of Antimicrobial Action of Silver Nanoparticles November 2016 *Frontiers in Microbiology* 7 Tikam Chand Dakal Anu Kumar Rita Singh Majumdar Vinod Yadav
37. Stability of Citrate, PVP, and PEG Coated Silver Nanoparticles in Ecotoxicology Media March 2012 *Environmental Science & Technology* 46(13):7011-7 Mila Tejamaya Isabella Römer Ruth C Merrifield Jamie R Lead
38. Xi-Feng Zhang,¹Zhi-Guo Liu,¹Wei Shen,² and Sangiliyandi Gurunathan *Int J Mol Sci.* Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches *Int J Mol Sci.* 2016 Sep; 17(9): 1534.
39. Effects of silver nanoparticles on human health January 2015 *European Journal of Nanomedicine* 7(1):51-62 Afshin Mohammadi Bardbori Mitra Korani Elham Ghazizadeh Zahra Hami
40. Shabir Ahmad,¹Sidra Munir,¹Nadia Zeb,^{1,2}Asad Ullah,¹Behramand Khan,¹Javed Ali,³Muhammad Bilal,³Muhammad Omer,⁴Muhammad Alamzeb,⁵Syed Muhammad Salman,¹ and Saqib Ali *Green nanotechnology: a review on green synthesis of silver nanoparticles — an ecofriendly approach Int J Nanomedicine.* 2019; 14: 5087–5107.
41. Holubnycha V, Kalinkevich O, Ivashchenko O, Pogorielov M. Antibacterial Activity of In Situ Prepared Chitosan/Silver Nanoparticles Solution Against Methicillin-Resistant Strains of *Staphylococcus aureus*. *Nanoscale Res Lett.* 2018 Mar 2;13(1):71. doi: 10.1186/s11671-018-2482-9.
42. Guo BL, Han P, Guo LC, Cao YQ, Li AD, Kong JZ, Zhai HF, Wu D. The anti-bacterial activity of Ta-doped ZnO nanoparticles. *Nanoscale Res Lett.* 2015;10:1047.
43. Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects Sukumaran Prabhu and Eldho K Poulouse *International Nano Letters* 2012,2:32 <http://www.inl-journal.com/content/2/1/32>
44. Yasaman Sadat NABIPOUR^{1,*}, Arman ROSTAMZAD² Comparing the antimicrobial effects of silver and copper nanoparticles against pathogenic and

resistant bacteria of *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* Science Journal (CSJ), Vol. 36, No: 3 Special Issue (2015)

45. Mechanism of antibacterial activity of copper nanoparticles Arijit Kumar Chatterjee, Ruchira Chakraborty and Tarakdas Basu Nanotechnology 25 (2014) 135101 (12pp)

46. L. Zhang, Y. Jiang, Y. Ding, M. Povey, D. York, Investigation into the antibacterial behaviour of suspensions of ZnO nanoparticles (ZnO nanofluids). J. Nanopart. Res. 9(3), 479–489 (2007). doi: 10.1007/s11051-006-9150-1

47. Sirelkhatim A. et al. Review on Zinc Oxide Nanoparticles: Antibacterial Activity and Toxicity Mechanism. Nano-Micro Lett. (2015) 7(3):219–242

48. Zhang Y et al. Nano Ag/ZnO-Incorporated Hydroxyapatite Composite Coatings: Highly Effective Infection Prevention and Excellent Osteointegration. ACS Appl Mater Interfaces. (2018)

49. Yogendra K. M., Rainer A. ZnO tetrapod materials for functional applications. Materials Today. Volume 21, Issue 6, July–August 2018, Pages 631-651.

50. Luting Y., Ashraf U., Haiwei W. ZnO Tetrapods: Synthesis and Applications in Solar Cells. Nanomaterials and Nanotechnology. 2015 <https://doi.org/10.5772/60939>

51. O. Yamamoto, Influence of particle size on the antibacterial activity of zinc oxide. Int. J. Inorg. Mater. 3(7), 643–646 (2001). doi: 10.1016/S1466-6049(01)00197-0

52. Khatir NM, Abdul-Malek Z, Zak AK, Akbari A, Sabbagh F. Sol–gel grown Fe-doped ZnO nanoparticles: antibacterial and structural behaviors, J Sol Gel Sci Tech. 2015:1–8.

53. X. Peng, S. Palma, N.S. Fisher, S.S. Wong, Effect of morphology of ZnO nanostructures on their toxicity to marine algae. Aquat. Toxicol. 102(3), 186–196 (2011).

54. Sharma N, Jandaik S, Kumar S, Chitkara M, Sandhu IS. Synthesis, characterisation and antimicrobial activity of manganese-and iron-doped zinc oxide nanoparticles. *J Exp Nanosci.* 2016;11:54–71.
55. Karunakaran C, Gomathisankar P, Manikandan G. Preparation and characterization of antimicrobial Ce-doped ZnO nanoparticles for photocatalytic detoxification of cyanide. *Mater Chem Phys.* 2010;123:585–94.
56. Antibiofilm activity of biogenic copper and zinc oxide nanoparticles-antimicrobials collegiate against multiple drug-resistant bacteria: a nanoscale approach. Ashajyothi¹• K. Handral Harish²• Nileshkumar Dubey²• R. Kelmani Chandrakanth¹ *J Nanostruct Chem* (2016) 6:329–341
57. Feng X., Feng L., Jin M., Zhai J., Jiang L., et al (2004) Reversible super-hydrophobicity to super-hydrophilicity transition of aligned ZnO nanorod films. *J. Am. Chem. Soc.* 126:62-63.
58. Jafari A et al. Bactericidal impact of Ag, ZnO and mixed AgZnO colloidal nanoparticles on H₃₇Rv Mycobacterium tuberculosis phagocytized by THP-1 cell lines. *Microb Pathog.* (2017)
59. Sirelkhatim A. et al. Review on Zinc Oxide Nanoparticles: Antibacterial Activity and Toxicity Mechanism. *Nano-Micro Lett.* (2015) 7(3):219–242
60. K.R. Raghupathi, R.T. Koodali, A.C. Manna, Size-dependent bacterial growth inhibition and mechanism of antibacterial activity of zinc oxide nanoparticles. *Langmuir* 27(7), 4020–4028 (2011). doi: 10.1371/journal.pone.0085981
61. Niu LN, Chen JH, Fang M, Yang JC, Xiao YH, Ni F. Effects of three different zinc oxide incorporation on the antibacterial activity against *Streptococcus mutans* of composite resin. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.* 2009 Apr;27(2):210-2
62. Karpuraranjith M et al. Chitosan/zinc oxide-polyvinylpyrrolidone (CS/ZnO-PVP) nanocomposite for better thermal and antibacterial activity. *Int J Biol Macromol.* (2017)

63. Zhang Y et al. Nano Ag/ZnO-Incorporated Hydroxyapatite Composite Coatings: Highly Effective Infection Prevention and Excellent Osteointegration. *ACS Appl Mater Interfaces*. (2018)
64. Synergistic Antibacterial Effect of Metal Oxid Nanoparticles and Ultrasound Stimulation Mahboubeh Mirhosseini *J. Biol. Today's World*. 2015 June; 4 (6): 138-144
65. Synergistic Antibacterial Effects of Metallic Nanoparticle Combinations C. Bankier, R. K. Matharu, Y. K. Cheong, G. G. Ren, E. Cloutman-Green & L. Ciric *Scientific Reports* volume 9, Article number: 16074 (2019)
66. Low-Frequency Ultrasound Debridement in Chronic Wound Healing: A Systematic Review of Current Evidence Ying-Ju Ruby Chang, MSc¹, Julie Perry, PhD¹, and Karen Cross, MD, PhD¹ *Plast Surg (Oakv)*. 2017 Feb; 25(1): 21–26
67. Combined Effect of Ultrasound Stimulations and Autoclaving on the Enhancement of Antibacterial Activity of ZnO and SiO₂/ZnO Nanoparticles Hajer Rokbani,¹ France Daigle,² and Abdellah Aji¹ *Nanomaterials (Basel)*. 2018 Mar; 8(3): 129. *
68. Karpuraranjith M et al. Chitosan/zinc oxide-polyvinylpyrrolidone (CS/ZnO-PVP) nanocomposite for better thermal and antibacterial activity. *Int J Biol Macromol*. (2017)
69. Nasajpour A. et al. Nanostructured Fibrous Membranes with Rose Spike-Like Architecture. *Nano Lett*. 2017 October 11; 17(10): 6235–6240. doi:10.1021/acs.nanolett.7b02929.
70. Tianhong Dai, Masamitsu Tanaka, Ying-Ying Huang, Michael R Hamblin. Chitosan preparations for wounds and burns: antimicrobial and wound-healing effects. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2011 Jul; 9(7): 857–879.
71. Dananjaya SHS et al. Synthesis, characterization of ZnO-chitosan nanocomposites and evaluation of its antifungal activity against pathogenic *Candida albicans*. *Int J Biol Macromol*. (2018)

72. Dash, M.; Chiellini, F.; Ottenbrite, R.M.; Chiellini, E. Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Prog. Polym. Sci.* 2011, *36*, 981–1014.
73. Lim, S.; Song, D.; Oh, S.; Lee-Yoon, D.; Bae, E.; Lee, J. In vitro and in vivo degradation behavior of acetylated chitosan porous beads. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 2008, *19*, 453–466.
74. Khan, M.A.; Mujahid, M. A review on recent advances in chitosan based composite for hemostatic dressings. *Int. J. Biol. Macromol.* 2019, *124*, 138–147.
75. Kong, M.; Chen, X.; Xing, K.; Park, H. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *Int. J. Food Microbiol.* 2010, *144*,
76. Kaya, M.; Baran, T.; Asan-Ozusaglam, M.; Cakmak, Y.S.; Tozak, K. Özcan; Mol, A.; Menteş, A.; Sezen, G. Extraction and characterization of chitin and chitosan with antimicrobial and antioxidant activities from cosmopolitan Orthoptera species (Insecta). *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 2015, *20*, 168–179.
77. Ngo, D.H.; Kim, S.K. Antioxidant Effects of Chitin, Chitosan, and Their Derivatives. *Adv. Food Nutr. Res.* 2014, *73*, 15–31.
78. Okamoto, Y.; Kawakami, K.; Miyatake, K.; Morimoto, M.; Shigemasa, Y.; Minami, S. Analgesic effects of chitin and chitosan. *Carbohydr. Polym.* 2002, *49*, 249–252.
79. Okamoto, Y.; Yano, R.; Miyatake, K.; Tomohiro, I.; Shigemasa, Y.; Minami, S. Effects of chitin and chitosan on blood coagulation. *Carbohydr. Polym.* 2003, *53*, 337–342.
80. De Lima, J.M.; Sarmiento, R.R.; De Souza, J.R.; Brayner, F.A.; Feitosa, A.P.S.; Padilha, R.; Alves, L.C.; Porto, I.J.; Batista, R.F.B.D.; De Oliveira, J.E.; et al. Evaluation of Hemagglutination Activity of Chitosan Nanoparticles Using Human Erythrocytes. *BioMed Res. Int.* 2015, *2015*, 1–6.
81. Khoshmohabat, H.; Paydar, S.; Kazemi, H.M.; Dalfardi, B. Overview of Agents Used for Emergency Hemostasis. *Trauma Mon.* 2016, *21*, 26023.
82. Yen, M.T.; Yang, J.H.; Mau, J.L. Antioxidant properties of chitosan from crab shells. *Carbohydr. Polym.* 2008, *74*, 840–844